

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین  
دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر آپوپتوتیک گیاه دارویی سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

اساتید راهنما

دکتر مجتبی شهنازی - دکتر عباس آزاد مهر

اساتید مشاور

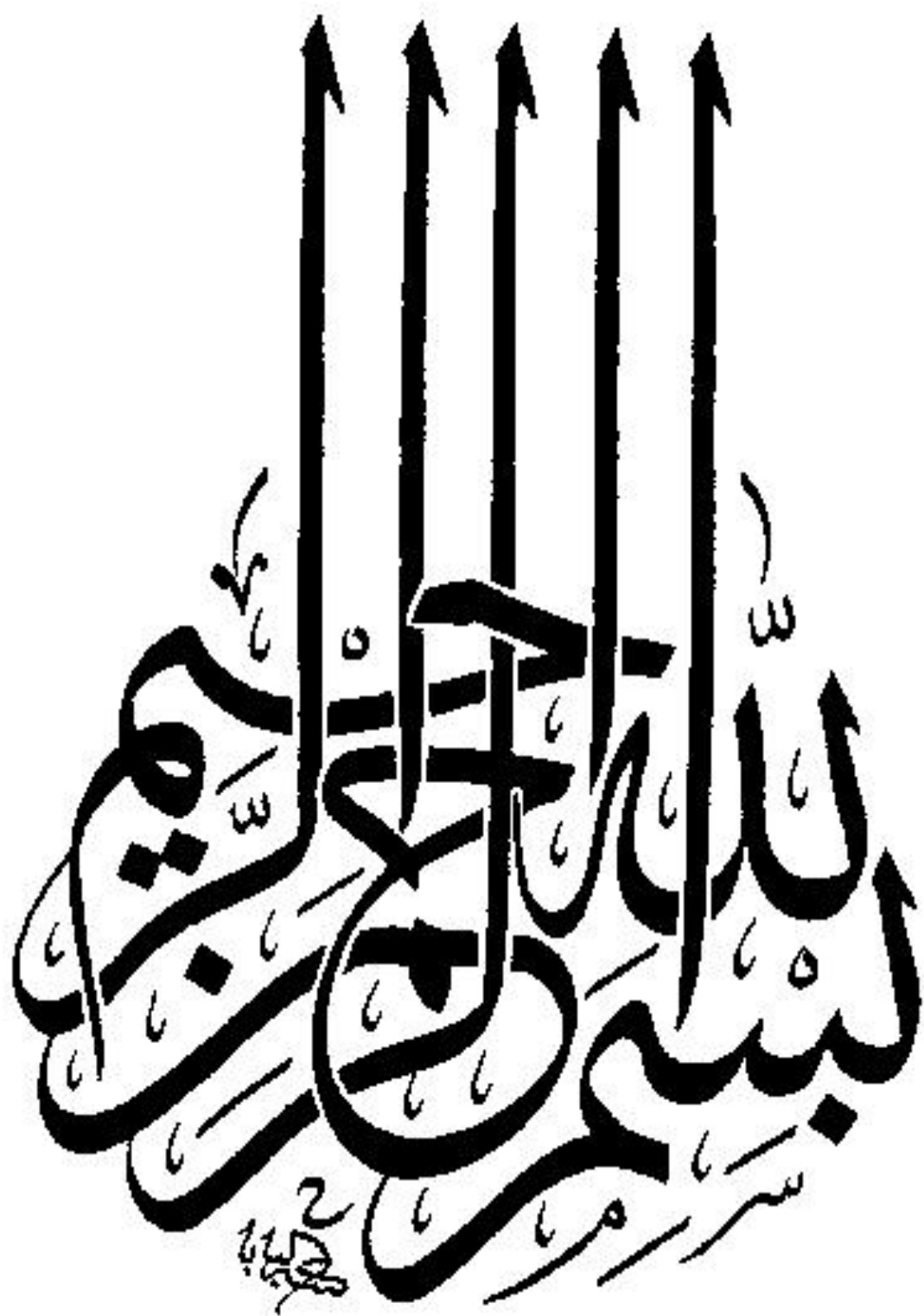
دکتر رضا حاجی آقایی - دکتر محمود علیپور

نگارش

مرضیه مکیان

سال تحصیلی: ۹۵-۹۶

شماره پایان نامه: ۷۳



تقدیم به پدر و مادر عزیزم

خدای را بی شکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیحت ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیایم و از ریشه آنها

شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم.

والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی

ام بوده اندستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند

تقدیم به همسر

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از

آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

باسپاس فراوان از اساتید گرامیم جناب آقای دکتر مجتبی شهنازی و جناب آقای دکتر عباس آزاد مهر که در کمال سعه صدر از

پیچ لکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند.

از زحمات اساتید مشاور محترم جناب آقای دکتر رضا حاجی آقایی و جناب آقای دکتر محمود علیپور بسیار سپاسگزارم چرا که

بدون راهنماییهای ایشان تائید این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

همچنین از استاد ارجمند جناب آقای دکتر مرزاد سرائی بابت راهنمایی های بزرگوارانه، سپاسگزارم.

## چکیده فارسی

### بررسی اثر آپوتوتیک گیاه دارویی سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

زمینه: گیاه *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*) به عنوان یک داروی گیاهی در درمان بسیاری از بیماریها از جمله بیماریهای عفونی موثر بوده و علیرغم مشخص شدن اثر اسکولیسیدالی آن، مکانیسم اثر آن تا حال شناخته نشده است.

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی القاء آپوتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید توسط گیاه دارویی *E. purpurea* می باشد.

مواد و روشها: پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط استریل تهیه و ویابیلیتی آنها توسط ائوزین ۱/۰ درصد مشخص شد. تعداد مناسب پروتواسکولکس ها برای انجام آزمایش، با استفاده از تست براد فورد مشخص و با غلظتهای مختلف از عصاره گیاه *E. purpurea* (۵، ۵۰ و ۱۰۰) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و حضور ۵٪ CO<sub>2</sub> در مدت زمان ۴ ساعت انکوبه شدند. ارزیابی القاء آپوتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها و سنجش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ توسط عصاره گیاه مذکور با استفاده از کیت های آپوتوزیس و کاسپازها به روش الایزا انجام شد.

یافته ها: تمامی غلظت های مورد استفاده از عصاره گیاه *E. purpurea* بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، علاوه بر داشتن اثر آپوتوتیک، باعث افزایش فعالیت کاسپازها از پروتواسکولکس ها شدند که این اثرات فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml معنی دار بود. اثر آپوتوتیک عصاره گیاه مذکور بر روی پروتواسکولکس ها در غلظتهای فوق، به ترتیب با ۳/۳۶٪ و ۹/۴۶٪ و اثر افزایشی آن در فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ در همان غلظتهای مذکور، به ترتیب برای کاسپاز ۳ با ۸۰/۴۱٪ و ۶۰/۵۸٪ و در مورد کاسپاز ۹ با ۴/۱۱٪ و ۴/۴۸٪ معنی دار بود. عصاره گیاه *E. purpurea* در فعالیت کاسپاز ۸ هیچگونه افزایش قابل ملاحظه ای نداشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، آپوتوزیس می تواند یکی از مکانیسمهای مهم اسکولیسیدالی عصاره گیاه *E. purpurea* باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

کلید واژه: کیست هیداتید، پروتواسکولکس، گیاه سرخارگل، آپوتوزیس، کاسپازها

## فهرست مطالب

فصل اول .....	۱
مقدمه .....	۱
طبقه بندی اکینوکوکوس .....	۲
مشخصات ریخت شناسی و بیولوژیک اکینوکوکوس گرانولوزوس .....	۳
کرم بالغ .....	۳
فرم لاروی (کیست هیداتید) .....	۴
غشا خارجی (لایه کوتیکولی یا موری) .....	۴
غشا داخلی (لایه زایا) .....	۴
چرخه تکاملی اکینوکوکوس گرانولوزوس .....	۵
اپیدمیولوژی اکینوکوکوس در جهان .....	۸
اپیدمیولوژی اکینوکوکوس در ایران .....	۹
بیماریزایی و علایم بالینی هیداتیدوز .....	۱۱
تشخیص هیداتیدوز .....	۱۲
تستهای آزمایشگاهی .....	۱۲
اوتوزینوفیلی .....	۱۲
پونکسیون کیست .....	۱۲

۱۲	..... روشهای مولکولی
۱۳	..... روشهای تصویر برداری
۱۳	..... روشهای ایمنولوژیک
۱۳	..... تست کازونی
۱۴	..... آگلوتیناسیون لاتکس
۱۴	..... هماگلوتیناسیون غیر مستقیم
۱۴	..... کو آگلوتیناسیون
۱۴	..... آزمایش ثبوت کمپلمان
۱۵	..... ایمنوالکتروفورز
۱۵	..... الایزا
۱۵	..... ایمنوبلات (وسترن بلات)
۱۶	..... کنترل و پیشگیری هیداتیدوز
۱۶	..... روشهای درمانی هیداتیدوز
۱۷	..... پاسخ های ایمنی علیه کیست هیداتیک
۱۷	..... مقاومت ذاتی ( ایمنی اولیه)
۱۹	..... ( ۲ ) مقاومت اکتسابی (ایمنی ثانویه):
۱۹	..... الف) ایمنی سلولار:
۲۰	..... ب) ایمنی همولار

آپوپتوزیس .....	۲۲
مولکول های تنظیم کننده آپوپتوزیس .....	۲۴
۱) پروتئین های خانواده مولکول 2 B-cell lymphoma (Bcl-2) .....	۲۴
۲) کاسپازها .....	۲۴
۳) ممانعت کننده های کاسپازی .....	۲۴
۴) مولکول P53 .....	۲۵
مسیرهای مرگ سلولی .....	۲۵
مسیر رسپتوری .....	۲۵
مسیر میتوکندریایی .....	۲۵
بیان مساله .....	۲۸
فصل دوم .....	۳۰
مروری بر متون .....	۳۰
سرخارگل .....	۳۰
فصل سوم .....	۳۷
اهداف و فرضیات .....	۳۷
هدف اصلی .....	۳۷
اهداف فرعی .....	۳۷
اهداف کاربردی .....	۳۷
فرضیه ها یا سؤال های پژوهش .....	۳۸



نوع مطالعه.....	۳۹
بررسی های آماری.....	۳۹
فصل چهارم.....	۴۰
مواد و روش ها.....	۴۰
تجهیزات مورد نیاز.....	۴۰
وسایل مصرفی.....	۴۰
محلول ها و مواد مصرفی.....	۴۱
کیت های مورد نیاز.....	۴۲
روش کار.....	۴۲
تهیه عصاره گیاهی.....	۴۲
تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها :.....	۴۳
تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل.....	۴۵
تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد.....	۴۷
تهیه رقت های ۵ mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره گیاه دارویی سرخارگل.....	۵۰
روش انجام آزمایش آپوپتوزیس بر اساس کیت: Cell Death Detection (Roche).....	۵۱
آماده کردن محلول های کار ( Working solutions ).....	۵۴
روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپوپتوزیس.....	۵۷
روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها ی ۳ ، ۸ و ۹ بر اساس کیت های شرکت <i>abcam</i> .....	۵۸

محتویات کیت ها و آماده کردن محلول ها ..... ۵۸

فصل پنجم ..... ۶۱

یافته ها ..... ۶۱

فصل ششم ..... ۷۸

بحث ..... ۷۸

نتیجه گیری ..... ۸۵

پیشنهادهات ..... ۸۵

## فهرست تصاویر

- تصویر ۱: کرم بالغ اکینوкокوس گرانولوزوس ..... ۳
- تصویر ۲: ساختمان کیست هیداتید ..... ۵
- تصویر ۳: چرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس ..... ۷
- تصویر ۴: پاسخ ایمنی در کیست هیداتید ..... ۲۱
- تصویر ۵: مسیر های مرگ سلولی ..... ۲۷
- تصویر ۶: گیاه سرخارگل ..... ۳۰
- تصویر ۷: پروتواسکولکس های زنده اکینوкокوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل ..... ۴۴
- تصویر ۸: پروتواسکولکس های مرده اکینوкокوس گرانولوزوس بعد از مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل ..... ۴۴
- تصویر ۹: روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها ..... ۴۶
- تصویر ۱۰: کیت تشخیص مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) ..... ۵۶

## فهرست جداول

- جدول ۱: جدول متغیرها ..... ۳۹
- جدول ۲: محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد ..... ۴۸
- جدول ۳: محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها ..... ۴۸
- جدول ۴: اثر آپوپتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید ..... ۶۲
- جدول ۵: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ ..... ۶۵
- جدول ۶: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، درافزایش فعالیت کاسپاز ۹ ..... ۶۸
- جدول ۷: اثر عصاره گیاه سرخارگل برروی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ ..... ۷۱
- جدول ۸: اثر مقایسه ای آپوپتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید با استفاده از تست Tukey ..... ۷۴
- جدول ۹: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از تست Tukey ..... ۷۵
- جدول ۱۰: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹، با استفاده از تست Tukey ..... ۷۶
- جدول ۱۱: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸، با استفاده از تست Tukey ..... ۷۷

## فهرست نمودار

- نمودار ۱: اثر آپوتوتیک عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بر اساس میزان جذب نوری نمونه ها در مقایسه با کنترل منفی ..... ۶۳
- نمودار ۲: اثر آپوتوتیک عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مقایسه با کنترل منفی بر حسب درصد ..... ۶۴
- نمودار ۳: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب جذب نوری ..... ۶۶
- نمودار ۴: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب درصد ..... ۶۷
- نمودار ۵: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب جذب نوری ..... ۶۹
- نمودار ۶: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب درصد ..... ۷۰
- نمودار ۷: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب جذب نوری ..... ۷۲
- نمودار ۸: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب درصد ..... ۷۳

## فهرست منحنی

- منحنی ۱: منحنی کالبراسیون تست براد فورد و مقایسه جذب نوری supernatant حاصل از پروتواسکولکس ها با جذب نوری استانداردها ..... ۴۹

## فصل اول

### مقدمه

هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماریهای زئونوز در ایران و جهان می باشد. این بیماری توسط فرم لاروی انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می شود و در اندامهای داخلی میزبانهای واسط (علف خواران و انسان) باعث ایجاد کیستهای هیداتید می گردد. میزبان اصلی انگل، سگ و سگ سانان بوده، علفخواران و همچنین انسان میزبان واسط انگل می باشند (۱، ۲). آلودگی در انسان از طریق خوردن آب و سبزیجات آلوده به تخم انگل، ایجاد می شود و توسط جایگزینی فرم لاروی انگل در اندامهای مختلف از جمله کبد، ریه، مغز و ... انسان به بیماری مبتلا می شود. این بیماری در بسیاری از کشورها از جمله ایران بومی است و گسترش و انتشار آلودگی به آن می تواند باعث ضررهای اقتصادی و بهداشتی فراوانی در ایران و جهان گردد (۴-۱). در حال حاضر بهترین روش درمان بیماری عمل جراحی است و برای جلوگیری از عود بیماری، تزریق مواد پروتواسکولیسیدال<sup>۱</sup> به درون کیستها حیاتی و مهم می باشد (۷-۵). در حال حاضر استفاده از مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی به جهت عوارض جانبی آنها محدود شده (۸) و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۹). ایمنی ذاتی بر علیه کیست هیداتید به عنوان یکی از مکانیسمهای احتمالی در سرکوب کیست هیداتید محسوب می شود (۱۲-۱۰). که اخیراً آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۱۳). این روش یکی از بهترین روشها، در از بین بردن انگلهای اکینوکوکوس گرانولوزوس می تواند باشد (۱۴).

---

<sup>1</sup> Protoscolisidal

## طبقه بندی اکینوкокوس :

اکینوкокوس از رده کرمهای پهن نواری شکل بوده و در روده بسیاری از مهره داران گوشتخوار دیده می شود. بر اساس آخرین گزارشات، جنس اکینوкокوس را به ترتیب زیر طبقه بندی کرده اند :

*Kingdom: Animalia*

*Phylum: Platyhelminthes*

*Class: Cestoda*

*Order: Cyclophyllidea*

*Family: Taeniidae*

*Genus: Echinococcus*

گونه های تأیید شده از جنس اکینوкокوس به شرح زیر می باشد :

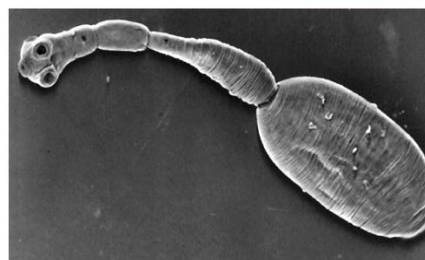
۱) <i>E. granulosus</i>	۱۷۸۲	Batsch
۲) <i>E. multilocularis</i>	۱۸۶۳	leukar
۳) <i>E. vogeli</i>	۱۹۷۲	Raush&Brenslein
۴) <i>E. oligarthrus</i>	۱۸۶۳	Diesing
۶) <i>E. equinus</i>	۱۹۶۳	Willidrn&Siueat man

لازم به یادآوری است که *E. equinus* اخیراً به عنوان گونه ای جدید در نظر گرفته شده است (۱۶،۱۵).

## مشخصات ریخت شناسی و بیولوژیک اکینو کوکوس گرانولوزوس:

### کرم بالغ:

طول این کرم ۳-۹ میلی متر بوده و اسکولکس آن گلابی شکل و به قطر حدود ۳۰۰ میکرون می باشد. اسکولکس مذکور دارای چهار بادکش فنجانی شکل با یک خرطوم غیر متحرک است که بر روی آن دو ردیف قلاب وجود دارد. تعداد قلابها ۳۰-۵۰ عدد بوده و اندازه آنها ۲۰-۴۰ میکرون می باشد. این انگل دارای گردن باریکی بوده که سر را به بدن متصل می کند. بدن از ۳-۴ بند تشکیل شده است که بند اول نارس، بند دوم و سوم رسیده، بند چهارم و پنجم بند بارور هستند. در بند رسیده، دستگاه تناسلی نر و ماده به صورت کامل وجود دارد. دستگاه تناسلی نر از ۴۵-۶۵ بیضه تشکیل شده که از آنها، مجاری آوران جدا شده و پس از تبدیل شدن به مجرای وایران به اندام تناسلی نر وصل می شوند. اندامهای تناسلی ماده این کرم دارای تخمدان دو قسمتی است و در زیر آن، غدد وتیلوژن قرار دارد. رحم کیسه ای شکل بوده و دارای یک تنه اصلی با ۱۵-۱۲ عدد انشعاب جانبی است و حاوی حدود ۵۰۰ تخم می باشد که اندازه تخم ها به قطر ۴۰-۵۰ میکرون می رسد که شکل آنها، گرد متمایل به بیضی می باشد. در قسمت جانبی بندها، منافذ تناسلی به طور نامنظم قرار دارند. در بند بارور انشعابات از رحم وجود دارد که داخل آن پر از تخم بوده و در اثر فشار، ترکیده تخم ها پخش می شوند. تخمها در دئودنوم توسط نمک های صفراوی، تریپسین و پانکراتین هضم و باعث آزاد شدن انکوسفر می شود (۱۷) (تصویر ۱).



تصویر ۱: کرم بالغ اکینو کوکوس گرانولوزوس



## فرم لاروی (کیست هیداتید):

به فرم لاروی اکینوкокوس گرانولوزوس که در داخل بدن میزبان واسط از جمله دام و انسان تشکیل می شود کیست هیداتید گفته می شود. کیست هیداتید دارای دو لایه است که توسط لایه محاط کننده کیست، احاطه می شود. لایه محاط کننده کیست، از مراحل اولیه شروع رشد کیست، به دور آن تشکیل می شود و توسط میزبان واسط ایجاد می شود (۱۸).

## غشا خارجی (لایه کوتیکولی یا موری)<sup>۱</sup>:

این لایه، سفید رنگ، ارتجاعی، سخت، هیالینی، چند لایه و فاقد هسته بوده و لایه محافظ کوتیکولی را تشکیل می دهد. در برابر باکتریها غیر قابل نفوذ بوده ولی مواد غذایی کریستالوئید و کلئوئید را طبق خاصیت اسمز از خود عبور می دهد. ترکیبات اصلی این غشاء مجموعه ای از پروتئین و پلی ساکارید می باشد که در آن نسبت گالاکتوز آمین به گلوکز آمین بیشتر است (۱۹، ۲۰).

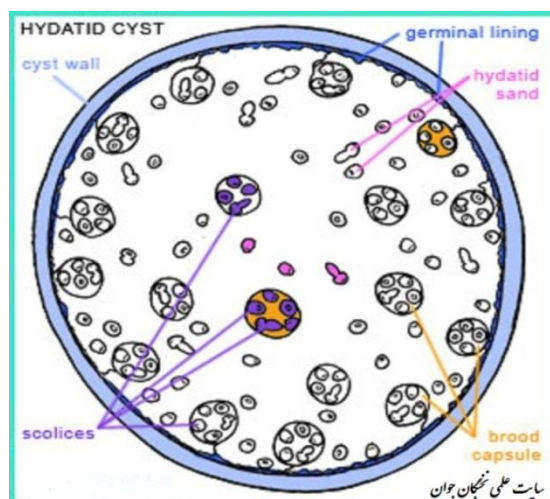
## غشا داخلی (لایه زایا)<sup>۲</sup>:

غشا داخلی، لایه ای بسیار نازک، دانه دار و به ضخامت ۲۵-۱۵ میکرون بوده و دارای سلولهای اپی تلئوئید و هسته های فراوان می باشد. در سطح داخلی آن کیسه های زایا جوانه می زنند که توسط رشته های کوتاهی به دیواره داخلی غشای زایا متصل می شوند. جدار داخلی کیسه های زایا از سلولهای زایا پوشیده شده که پروتواسکولکس ها را به وجود می آورند (۲۱، ۲۲). مایع هیداتید مایعی صاف با وزن مخصوص ۱۰۰۷ تا ۱۰۱۵ بوده و حاوی مواد مختلفی از قبیل آلبومین، پروتئین، کلرور سدیم، املاح فسفات، کلسیم، سوکسینات، قند، چربی و آنزیم می باشد. کپسولهای زایا و پروتواسکولکس ها در درون این مایع شناورند. مایع هیداتید معمولاً فاقد میکروب بوده ولی محیط مساعدی برای رشد باکتری ها است. اگر مایع کیست هیداتید را در ظرفی خالی کنیم،

<sup>۱</sup>Laminated layer

<sup>۲</sup> Germinal layer

پروتواسکولکس ها و کپسولهای زایا پس از مدتی به صورت شن ریزه در ظرف رسوب می کنند که به آنها شن هیداتید<sup>۱</sup> می گویند (۲۲) (تصویر ۲).



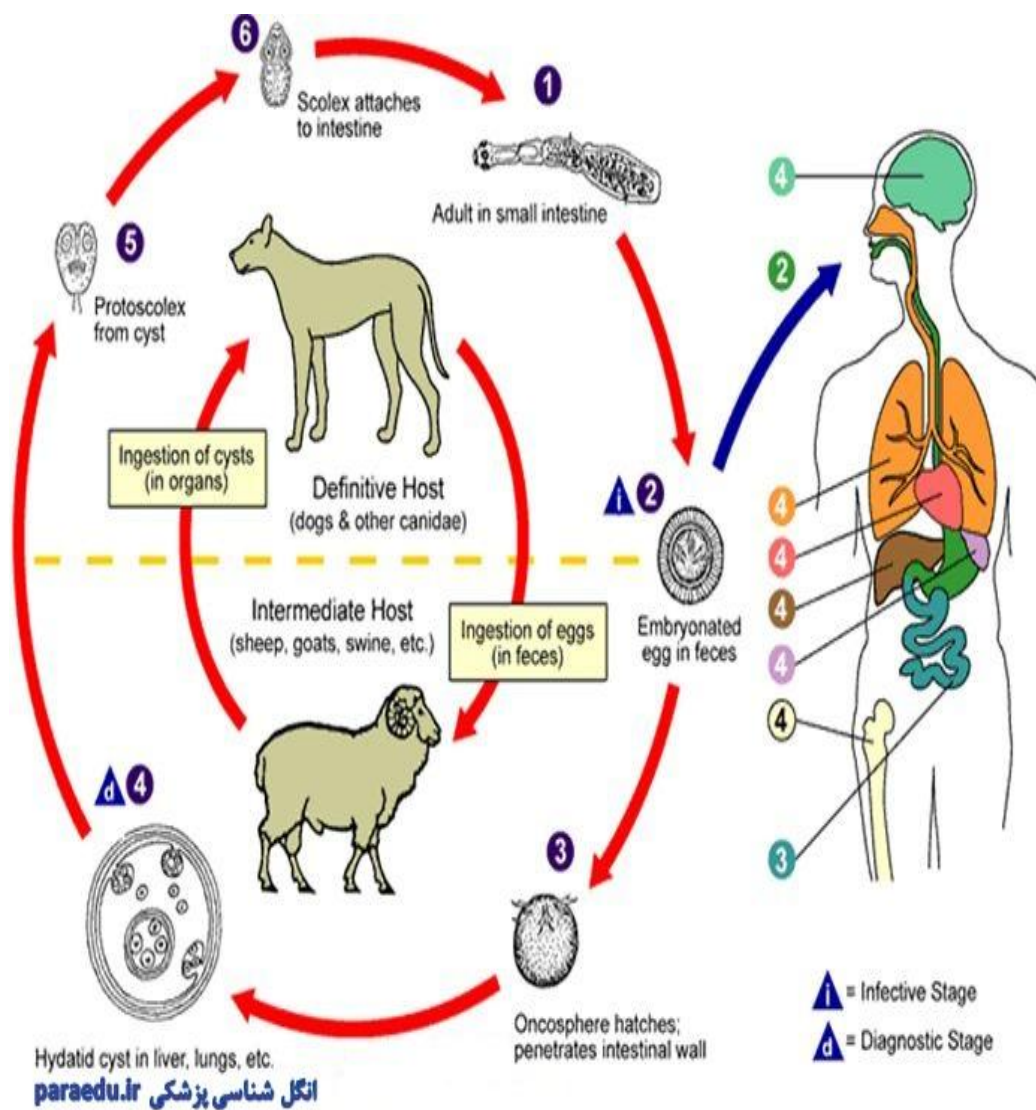
تصویر ۲: ساختمان کیست هیداتید

### چرخه تکاملی اکینوкокوس گرانولوزوس:

اکینوкокوس گرانولوزوس برای تکمیل چرخه زندگی خود به دو میزبان واسط و نهایی نیاز دارد. میزبان نهایی اکینوкокوس گرانولوزوس در دنیا عمدتاً از خانواده سگ سانان می باشند. کرم بالغ این انگل علاوه بر سگ، از گرگ، شغال زرد و روباه قرمز نیز جدا شده است. کرمهای بالغ به تعداد فراوان در روده کوچک میزبان نهایی زندگی می کنند. مدت زمان لازم برای بالغ شدن کرم و تخم ریزی آن در روده سگ ۶-۹ هفته است. بند آخر کرم که بند بارور می باشد، حاوی تعداد زیادی تخم بوده که در داخل روده و یا خارج از بدن ترکیده و تخم های اکینوкокوس گرانولوزوس که مقاومت زیادی نسبت به عوامل خارجی از جمله تغییرات دما دارند، آزاد شده و سبب آلودگی مراتع و مزارع و آب می گردند (۲۳).

<sup>1</sup> Sand hydatid

میزبان واسط انگل را عمدتاً علفخواران تشکیل می دهند. میزبانهای واسط حیوانی و همچنین انسان با خوردن آب، سبزیجات، و مواد آلوده به تخم یا تماس مستقیم با سگ، تخم را وارد دستگاه گوارش خود کرده و آلوده می شوند. به دنبال بلع تخم توسط میزبانهای واسط، انکوسفر از تخم آزاد شده و تحت تاثیر آنزیم های پروتئولیتیک مثل پپسین، پانکراتین و نمک های صفراوی فعال می گردند. انکوسفر به ویلی های ژوژنوم و ابتدای ایلئوم روده در میزبان واسط نفوذ می کنند. ترشحات انکوسفر در سبب تحریک و تقویت نفوذ انگل در بافت میزبان موثر می باشد. انکوسفر، از مخاط و جداره روده باریک عبور کرده و توسط گردش خون خود را به کبد و سایر اعضای بدن می رساند (۲۴). سه هفته پس از توقف جنین در اعضای مختلف میزبان واسط، کیسه ای در اطراف آن تشکیل، و به کیست هیداتید تبدیل می گردد. رشد کیست بستگی به محل جایگزینی آن دارد. اگر نسج اطراف کیست، نرم باشد در مدت ۳ ماه اندازه آن به ۵ سانتی متر می رسد. کیست ها ممکن است خود بخود غیر فعال و آهکی گردند یا اینکه در اثر آلودگی میکروبی، چرکی شوند. چنانچه کیست ها در اثر ضربه یا عمل جراحی، پاره شده و پروتواسکولکس ها به همراه مقداری از غشاء زایا در بدن میزبان واسط پراکنده شوند، کیست های جدیدی مانند کیست های اولیه ایجاد خواهد شد که به کیستهای ثانویه مشهور هستند. در صورتی که سگ یا میزبانان نهایی دیگر، از اندام های آلوده به کیست هیداتید تغذیه کنند، قسمت سر پروتواسکولکس ها در روده باریک میزبان نهایی خارج شده و در نهایت تبدیل به کرم بالغ می گردند (۲۲) (تصویر ۳).



تصویر ۳: چرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس

## اپیدمیولوژی اکینوکوکوس در جهان:

بیشترین شکل انتقالی اکینوکوکوس، در چرخه اهلی و بین سگ و دام ها اتفاق می افتد و یک مشکل بهداشتی جدی محسوب می شود. بیشترین میزان شیوع بیماری حاصله از انگل، در بین انسان و حیوانات در مناطقی رخ می دهد که پرورش سنتی دام ها، بسیار رواج داشته و سگ ها به تعداد زیادی به عنوان سگ گله نگهداری می شوند و لاشه دام های مرده یا احشا آنها در دسترس سگ ها قرار می گیرد. عواملی از قبیل بهداشت فردی و ویژگی های اقتصادی – اجتماعی و فرهنگی در انتشار انگل و بیماری موثر می باشند (۲۶، ۲۵).

اکینوکوکوس گرانولوزوس انتشار جهانی داشته ولی اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس در قطب شمال و نیم کره شمالی و کشورهای سردسیر مانند آلاسکا، باواریا، سوئیس، روسیه و کانادا دیده می شود. گونه های اکینوکوکوس وگلی و اکینوکوکوس الیگارتوس از آمریکای مرکزی و جنوبی گزارش شده اند. وجه تمایز گونه های مذکور از هم، خصوصیات مورفولوژیک مراحل لاروی و بالغ آنهاست (۲۸، ۲۷).

اکینوکوکوس گرانولوزوس در کشورهای شمال آفریقا و به صورت گسترده مشاهده شده و به طور عمده از کشورهای تونس، مصر، لیبی و الجزیره گزارش شده است. انگل مذکور در بیشتر کشورهای غربی و مرکزی آفریقا نیز دیده شده است (۳۰، ۲۹).

در آسیا نیز، این انگل از قسمت های وسیعی از چین مشاهده شده و در ایران، عراق، کویت، پاکستان، عربستان، قزاقستان، تاجیکستان، ترکمنستان و ازبکستان و دیگر نواحی خلیج ساحلی و کشورهای شمال شرقی حائز اهمیت می باشد (۳۰-۳۲). در اروپا اکینوکوکوس گرانولوزوس در اکثر کشورها دیده شده ولی از بعضی کشورها مانند ایرلند و دانمارک تا بحال گزارش نشده است. در برخی کشورهای پیشرفته، در اثر برنامه های کنترلی موفقیت آمیز، کاهش چشمگیری در انتشار بیماری صورت گرفته و در ایسلند، نیوزلند، تاسمانیا، انگل

مذکور ریشه کن شده است. در بریتانیا، انتشار انگل محدود بوده و به طور عمده در مرکز و جنوب ولز وجود دارد و در نواحی مدیترانه ای و شرق اروپا مانند بلغارستان اندمیک می باشد (۳۳،۳۰). در آمریکا کانونهای کمی از انگل وجود دارد و کانونهای مذکور در مناطق خاصی از ایالت یوتا، کالیفرنیا، آریزونا و نیومکزیکو دیده می شود. در آمریکای شمالی، انگل از کانادا و آلاسکا گزارش شده و در آمریکای جنوبی بخصوص آرژانتین، اروگوئه و پرو پراکندگی بیشتری دارد. در منطقه صحرا انگل مذکور در تورکانا و کنیا بیشتر مورد توجه می باشد (۳۴، ۳۰). در استرالیا این انگل بسیار شایع بوده و به عنوان یک مشکل بهداشتی می باشد (۳۰).

### اپیدمیولوژی اکینوکوکوس در ایران:

در ایران تاکنون دو گونه اکینوکوکوس گرانولوزوس و اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس گزارش شده که اکینوکوکوس گرانولوزوس از لحاظ اپیدمیولوژی و بیماریزایی بیشتر مورد اهمیت می باشد. اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس، بیشتر از ناحیه دشت مغان گزارش شده که دارای چرخه وحشی می باشد. دامنه های کوههای البرز و زاگرس، برای حفظ و بقا تخم انگل، شرایط مناسب را دارا می باشند (۳۵،۲۲).

در سال ۱۳۴۹ سه شکل بیولوژیکی از چرخه انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس (مرتعی، صحرایی و وحشی) توسط دکتر موبدی شرح داده شد (۳۵). چرخه انتقال مرتعی از ناحیه شمال غربی ایران و دامنه های زاگرس و البرز تا شمال شرقی و مناطق مرکزی و غربی کشیده شده است. در مناطق جنوبی، جنوب شرقی و جنوب غربی، بدلیل شرایط اقلیمی نامناسب، بیماری کمتر مشاهده می گردد. در تحقیقی که توسط دلیمی و همکاران در فاصله سالهای ۱۳۷۶-۱۳۷۹ در غرب کشور انجام شده، میزان شیوع در میزبانهای نهایی (سگ ۱۹/۱ درصد، شغال ۲/۳ درصد) و در میزبان های واسط (گوسفند ۱۱/۱ درصد، بز ۶/۳ درصد، گاو ۱۶/۴ درصد و گاومیش ۱۲/۴ درصد) گزارش شده است (۳۲). چرخه انتقال صحرایی در مناطق صحرایی و نیمه صحرایی ناحیه مرکزی ایران دیده می شود که شتر با توجه به عمر طولانی که دارد، میزبان واسط مهمی برای حفظ انگل در این مناطق می باشد (۳۵،۲۲). استان خراسان یکی از مناطق فرابومی و هایپراندمیک انگل و بیماری حاصله می باشد و

کمترین موارد گزارش شده در کشور، متعلق به استان سیستان و بلوچستان است. در ایران بدلیل تنوع آب و هوایی شیوع بیماری در مناطق مختلف متفاوت است. این بیماری از یک سو، خسارتهای اقتصادی قابل توجهی را به جامعه تحمیل نموده و از سویی دیگر سبب ضررهای مادی بر بیماران و کاهش نیروی انسانی می گردد (۳۶،۳۵).

در سال ۱۳۸۳ تا سال ۱۳۸۶ در بیمارستانهای شهر قم، پرونده پزشکی ۱۹ بیمار مبتلا به کیست هیداتید بررسی شد که ۱۲ نفر مونث و ۷ نفر مذکر بودند. بیشترین میزان آلودگی در گروه سنی ۲۱ تا ۳۰ سال مشاهده شد و از نظر اعضای مبتلا، کبد در ۱۴ نفر و ریه در ۵ نفر، در گیری داشتند. تمامی بیماران مبتلا به کیست هیداتید ریوی مذکر بودند (۳۷).

در استان چهار محال و بختیاری، در سالهای ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۶، پرونده ۱۴۴ نفر که دارای بیماری هیداتیدوز بودند مورد بررسی قرار گرفت که ۹۸ نفر مونث و ۴۶ نفر مذکر بودند. از نظر سنی بیشترین و کمترین فراوانی به ترتیب در بین افراد ۲۷ تا ۴۱ سال و بیش از ۷۲ سال مشاهده گردید. ۹۳ نفر از افراد مورد مطالعه ساکن روستا و ۵۱ نفر شهر نشین بودند. از نظر شغلی، بیشترین فراوانی، به ترتیب در زنان خانه دار، دامداران، کشاورزان، دانش آموزان، مشاغل آزاد و کارمندان دیده شد. از نظر محل استقرار کیستها در اعضای مختلف بدن، ۹۷ مورد کیست در لوب راست کبد، ۱۸ مورد در لوب چپ کبد، ۱۵ مورد در قسمت راست ریه، ۷ مورد در قسمت چپ ریه، ۲ مورد در کلیه و ۲ مورد خارج ریه، همچنین در سیستم اسکلتی، طحال و خلف صفاق، در هر کدام از اعضاء مذکور یک مورد گزارش گردید. بیشترین علایم بالینی در افراد مورد مطالعه، به ترتیب درد شکم، تهوع، استفراغ، سر درد، سرفه، تنگی نفس، درد قفسه سینه، کاهش وزن، بی اشتهایی و اختلالات ادراری گزارش گردید (۳۸).

مطالعه ای که در سال ۱۳۷۲ در شهرستان ساری و اطراف آن و بر روی سگ انجام گرفت، شیوع کرم بالغ اکینوکوکوس گرانولوزوس به ترتیب ۴۶/۷ درصد و ۲۰ درصد گزارش گردید. در مطالعه دوم که در سال

۱۳۸۶ در مناطق فوق انجام شد، هیچ موردی از انگل در سگها مشاهده نشد که می تواند مربوط به رعایت مسائل بهداشتی در مناطق مذکور باشد (۳۹).

از اردیبهشت تا آبان ماه ۱۳۸۶، در کشتارگاه کرج، از میان ۸۰۹۴۷ راس گوسفند بررسی شده از مناطق مختلف ایران، تعداد ۱۵۳۰ (۱/۸۹٪) راس گوسفند، مبتلاء به کیست هیداتید بودند که بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به مشهد و کرج به میزان  $3/83$  و  $0/83$  درصد بود. یافته های بررسی فوق نشان دهنده متفاوت بودن شیوع بیماری در مناطق مختلف ایران بوده و کاهش بیماری نسبت به دهه های گذشته را نشان می دهد (۴۰).

### بیماریزایی و علایم بالینی هیداتیدوز:

کیست های هیداتید می توانند در اکثر ارگانهای بدن، جایگزین شده و علائم بالینی متفاوتی ایجاد نمایند. ظهور ناگهانی علائم، ممکن است در اثر پارگی خود بخودی کیست ها یا پارگی ناشی از ضربه وارده به آنها، ایجاد شوند (۲۸). علایم بالینی هیداتیدوز کبدی، بصورت بزرگی کبد و در موارد پیشرفته، یرقان انسدادی و قولنج های کبدی باشد. یرقان، در اثر فشار کیست به مجاری صفراوی ایجاد می شود (۴۱، ۴۲). در مجاری ادراری، کیست ها باعث مشکلات دستگاه ادراری و سوزش مجاری ادرار شده (۲۷، ۴۳) و در ریه، می توانند باعث اختلالات تنفسی از جمله تنگی نفس، سرفه های خشک، همراه با خلط و تغییر صداها تنفسی شوند. اغلب کیستهای ریوی به علت فقدان لایه فیبروز، پاره شده و قطعات کیست به خارج دفع می شوند. در برخی موارد، قرار گرفتن کیست ها در مجاری تنفسی، می تواند باعث ایجاد ایست تنفسی شود (۴۴). وجود کیست در مغز باعث اختلالات مغزی مانند صرع و تشنج شده و مستقر شدن آنها در نخاع و در بین مهره ها می تواند به فلج اندام ها منجر شود. به دلیل ریز بودن کیستهای نخاعی، عمل جراحی آنها می تواند مشکل ساز باشد (۴۵). وجود کیست ها در استخوانها، می تواند رشد سرطانی داشته و منجر به شکستگی آنها شود. مایع کیست ها در اثر پاره شدن آنها خارج شده و می توانند سبب کهیرو خارش در افراد آلوده شوند (۲۷، ۴۶).



## تشخیص هیداتیدوز:

تشخیص به موقع بیماری هیداتیدوز می تواند به پیشرفت قابل توجهی در کنترل و درمان بیماری منتهی شود. بیش از نیمی از موارد بیماری فاقد علائم بالینی هستند. در مناطق اندمیک بیماری، گرفتن تاریخچه از بیمار و بررسی علائم بالینی می تواند کمک کننده باشد، ولی این روش به هیچ عنوان نمی تواند یک روش مطمئن و دقیق در تشخیص بیماری باشد (۲۳). تشخیص هیداتیدوز به روشهای زیر امکان پذیر است:

## تستهای آزمایشگاهی:

### اُئوزینوفیلی:

اصولا در بیماری های انگلی، افزایش اُئوزینوفیل های خون مشاهده می گردد که این اُئوزینوفیلی گاهی تا ۶۰ درصد هم می رسد. این یافته، به تنهایی نمی تواند ارزش تشخیصی داشته باشد. افزایش آنزیمهای کبدی، مثل بیلی رو بین و آمیلاز نیز در این بیماران مشاهده می گردد که این ها نیز به تنهایی ارزش تشخیصی برای کشف بیماری را ندارند (۲۳، ۲۴).

### پونکسیون کیست:

این روش بسیار خطرناک بوده و در صورت تراوش مایع کیست در محیط، می تواند باعث واکنشهای آنافیلاکتیک شده و همچنین انتشار پروتواسکولکس های درون کیست به محیط داخلی شکم، در ایجاد کیستهای ثانویه دخیل هستند. در صورتی که باروش های تصویر برداری، وجود کیست تشخیص داده شود، با پونکسیون کیست ها و مشاهده پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ، وجود بیماری تایید می گردد (۲۸).

### روشهای مولکولی:

این تکنیک ها بر اساس انتخاب پرایمرها و پروپهای مختلف صورت می گیرد. امروزه چندین روش مولکولی در دسترس می باشند که به سرعت می توانند سویه های اِکینوکوکوس گرانولوزوس را با استفاده از مارکرهای مولکولی شناسایی کنند که مطالعات مذکور می تواند باعث روشن شدن وضعیت اپیدمیولوژی انگل در یک

منطقه گردد. البته استفاده از این روش های فوق، نیازمند وسایل پیشرفته و متخصصین ورزیده می باشد (۵۰-۴۷).

### روشهای تصویر برداری:

این روشها از جمله اولتراسونوگرافی<sup>۱</sup>، MRI<sup>۲</sup> و سی تی اسکن در تشخیص بیماری کاربرد زیادی دارند ولی پر هزینه هستند و کیفیت تشخیصی آنها به مهارت رادیولوژیست ها بستگی دارد و در مناطق اندمیک ممکن است در دسترس نباشند. در این روشها، ضایعات کوچک که در عمق بافتها قرار دارند به سختی تشخیص داده می شوند، بنابراین به تنهایی ممکن است روش مناسبی برای تشخیص بیماری نباشند (۵۱، ۵۲).

### روشهای ایمنولوژیک:

با وجود اینکه تست های سرولوژیک اهمیت بسیار بالایی در تشخیص بیماری هیداتیدوز دارند ولی در مناطق غیر اندمیک بیماری، ارزش تست های سرولوژیکی پائین بوده و باید با روشهای تصویر برداری همراه شوند. تست های پارازیتولوژیک و آزمایشات پاتولوژیک در تائید تشخیص، کمک کننده هستند (۵۱، ۵۲).

### تست کازونی<sup>۳</sup>:

این تست، به علت فقدان ویژگی مناسب و داشتن واکنش متقاطع با سایر انگل ها و بعضی بیماریهای غیر انگلی، کاربرد چندانی ندارد. در این تست، مقدار یک دهم میلی لیتر، آنتی ژن خام مایع هیداتید، بصورت داخل جلدی و در ناحیه ساعد، تزریق می شود و در صورت مثبت بودن، پس از بیست دقیقه، واکنش به صورت برجستگی سفید رنگی به قطر تقریبی یک سانتی متر ظاهر می شود که اطراف آن قرمز بوده و خارش شدید دارد (۵۳).

---

<sup>1</sup> Ultra sonography

<sup>2</sup> Magnetic Resonance Imaging

<sup>3</sup> Casoni test

### آگلوتیناسیون لاتکس<sup>۱</sup>:

این تست آسان و ارزان بوده و حساسیتی معادل صد درصد و ویژگی معادل ۷۴ درصد دارد. در این تست، از ذرات لاتکس، بعنوان حامل آنتی ژن، استفاده می کنند. در تست مذکور، رقت هایی از سرم، با ذرات لاتکس حساس شده و با آنتی ژن های خام هیداتید، مخلوط شده و در مدت ده دقیقه، موارد مثبت، بصورت آگلوتینه، ظاهر می شوند (۵۴).

### هماگلوتیناسیون غیر مستقیم<sup>۲</sup>:

این تست یکی از حساسترین آزمایشها، برای تشخیص هیداتیدوز بشمار می رود و مقادیر بسیار کمی از آنتی بادی را می تواند مشخص کند. تست مذکور همانند اکثر تست های قدیمی، دارای واکنش های متقاطع معنی دار، با سرم بیماران مبتلا به سایر بیماریهای انگلی می باشد (۵۵).

### کو آگلوتیناسیون<sup>۳</sup>:

این تست یک تست آگلوتیناسیون غیر مستقیم بوده که ابتدا در افراد مبتلا به آبسه های آمیبی، جهت اندازه گیری آنتی ژن آمیب به کار می رفت، ولی بعد ها، تست مذکور برای تشخیص کیست هیداتید و جهت اندازه گیری آنتی ژنهای ترشح شده در ادرار بکار برده شد (۵۶).

### آزمایش ثبوت کمپلمان<sup>۴</sup>:

در این تست از مایع هیداتید، بعنوان آنتی ژن استفاده می شود. این تست، درصد بالایی مثبت کاذب دارد و بدلیل فاکتور های ضد کمپلمان در مایع هیداتید، از ویژگی کمتری برخوردار است (۵۷).

---

<sup>1</sup> Latex Agglutination

<sup>2</sup> Indirect Hemagglutination

<sup>3</sup> Coagglutination

<sup>4</sup> Complement Fixation test

## ایمنوالکتروفورز<sup>۱</sup>:

با استفاده از این روش، آنتی ژن های کیست هیداتید ترشح شده در ادرار را اندازه گیری می کنند. اساس این روش، بر ایجاد کمان رسوبی در مقابل ترکیب آنتی ژن و آنتی بادی کیست هیداتید می باشد (۵۱).

## الایزا<sup>۲</sup>:

آزمون الایزا با اتصال دادن آنتی ژنهای مربوط به کیست هیداتید، بر روی سطوح چاهک میکرو پلیت های پلی استیرن و یا لوله هایی از همین جنس انجام می شود. حساسیت الایزا، بیشتر از سایر تست های سرولوژیکی بوده و امروزه بطور گسترده بیش از تست های دیگر کاربرد داشته و دارای اعتبار لازم و قابل قبولی جهت تشخیص هیداتیدوز انسانی می باشد (۵۸).

## ایمنوبلات (وسترن بلات)<sup>۳</sup>:

در این روش، استفاده از آنتی ژنهای تخلیص شده کیست، در تشخیص بیماری هیداتیدوز بسیار موثر بوده و در بررسی و تحت نظر قرار دادن بیمار، مفید می باشد. از زمان معرفی وسترن بلات، توجهات روز افزونی بر روی آنتی ژن B به عنوان یک آنتی ژن مناسب در تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز انسانی معطوف شده است. زیر واحد کوچکتر آنتی ژن B که وزن مولکولی آن ۱۲ کیلو دالتون بر آورد شده مختص گونه گرانولوزوس گزارش شده، ولی در پژوهش های بعدی مشخص گردید زیر واحد مذکور با آنتی بادهای سرم مبتلایان به کیست اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس، می تواند واکنش متقاطع نشان دهد (۵۹).

<sup>1</sup> Immunoelectrophoresis

<sup>2</sup> Enzym linked Immunosorbent Assay

<sup>3</sup> Immunoblot or Western blot

## کنترل و پیشگیری هیداتیدوز:

با توجه به اهمیت بیماری هیداتیدوز در انسان و حیوان، کنترل و پیشگیری از بیماری حائز اهمیت بوده و اقدامات زیر می توانند موثر باشند:

- ۱- جلوگیری از تغذیه سگ ها از اندامهای آلوده به کیست دامها.
  - ۲- کشتار دام ها در کشتارگاههای بهداشتی.
  - ۳- از بین بردن سگ های ولگرد و داشتن آمار سگ های صاحب دار.
  - ۴- درمان سگ های گله با داروهای پرازی کوانتل .
  - ۵- عدم نگهداری سگ و خودداری از تماس مستقیم با آن.
  - ۶- سالم سازی و شستن کامل سبزیجات.
  - ۷- آموزش عمومی افرادی که در معرض خطر می باشند ( مثل چوپانان، دامداران، روستائیان و ..... ) (۶۰).
- برنامه دیگر برای کنترل بیماری طراحی واکسن در گوسفندان است که در یک مطالعه کارآزمایی نزدیک به صد درصد ایمنی ایجاد نموده است. بنابراین بهتر است برنامه واکسیناسیون همراه با تجویز دارو های ضد انگلی برای سگها باشند، تا انتقال به انسان را کاهش دهد و همچنین سرآغازی برای برنامه های کنترلی باشد (۶۰).

## روشهای درمانی هیداتیدوز:

در حال حاضر سه روش برای درمان بیماری وجود دارد که شامل جراحی<sup>۱</sup>، PAIR (پونکسیون کیست، آسپیره کردن مایع کیست، تزریق ماده پروتواسکولیسیدال کش به درون کیست و آسپیره کردن مجدد آن) و دارو درمانی می باشد. جراحی بعنوان درمان انتخابی در ۹۰ درصد از بیماران می تواند اعمال گردد و هنوز هم به عنوان اقدام اساسی در درمان بیماری می باشد. در این روش، امکان پارگی کیست ها و عود بیماری وجود داشته جراحان برای جلوگیری از عود بیماری، تزریق مواد پروتواسکولکس کش به داخل کیست هیداتید، قبل از عمل

<sup>1</sup> Puncture aspiration ingestion reaspiration

جراحی را توصیه می کنند. یکی دیگر از روشهای درمانی، روش PAIR می باشد. در سالهای اخیر استفاده از روش مذکور به عنوان روش درمانی جایگزین معرفی شده است (۶۱، ۶۲). مطالعات نشان می دهد که استفاده از روش ترکیبی PAIR و داروی آلبندازول می تواند روش نسبتاً موثری برای درمان کیست کبدی باشد. در حال حاضر بهترین دارو برای درمان، آلبندازول می باشد. میزان آلبندازول مصرفی، روزانه ۱۵-۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن و به مدت ۳-۶ ماه توصیه شده است (۶۳، ۶۴).

### پاسخ های ایمنی علیه کیست هیداتیک:

پاسخ های ایمنی از طریق مکانیسم های وابسته به ایمنی ذاتی (اولیه) و ایمنی اکتسابی (ثانویه) (ایمنی سلولار و همولار) تولید می شوند. این پاسخ شامل موارد زیر می باشد:

### مقاومت ذاتی ( ایمنی اولیه):

مقاومت ذاتی ۲ الی ۴ هفته پس از بلع تخم و آزاد شدن انکوسفر صورت می گیرد. سن، جنس و موقعیت فیزیولوژیکی میزبان، ممکن است، مقاومت در برابر عفونت را تحت تاثیر قرار دهد. اولین ایمونوگلوبولین پس از عفونت، از نوع Ig G می باشد که این ایمونوگلوبو لین در موش دو هفته، در گوسفند یازده هفته و در میمون چهار هفته پس از آلودگی، قابل تشخیص هست. عفونت اولیه ممکن است مرتبط با پاسخهای التهابی سلول باشد. از این رو افزایش لوکوسیت ها، مخصوصاً نئوتروفیل ها، لنفوسیت ها و ماکروفاژها مشاهده می شوند. مطالعه در شرایط آزمایشگاهی، نشان داده که نوتروفیل ها در ارتباط با آنتی بادی، تقریباً می توانند انکوسفرهای اکینوکوکوس گرانولوزوس را از بین ببرند. در عفونت های ثانویه، ابتدا ماکروفاژها فعال شده، سپس نوتروفیل ها، نئوتروفیل ها و لنفوسیت ها وارد عمل می گردند و اینترلوکینهای ۱۰، ۴ و ۵ یک هفته پس از عفونت قابل شناسایی هستند. سطح بالای فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)، اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶، IgG1 و 3 در سرم، قابل شناسایی می باشند. این اطلاعات نشان می دهد که واکنش TH2 در شروع پاسخ ایمنی به عفونت ثانویه ایجاد می شود. پاسخ ایمنی در برابر کیست های کامل، افزایش سطح آنتی بادی، مخصوصاً

افزایش IgG، IgM و IgE را نشان می دهد. ائوزینوفیلی و تولید مقادیر زیاد IgE نتیجه شایع در عفونتهای کرمی است. ائوزینوفیل ها نسبت به نوتروفیل ها کمتر بیگانه خواری می کنند. اما نوتروفیل ها قادرند مرحله لاروی انگل ها، از جمله اکینوکوکوس را از بین ببرند. فعالیت آنها با سایتوکاین ها افزایش پیدا می کند (۳۶، ۱۴، ۱۳). طی مطالعه ای مشخص شده که با استفاده از روش سنجش اینترلوکین ۴ می توان عود بیماری را در بیماران مبتلا به کیست هیداتید پیش بینی کرد. اگر اینترلوکین ۴ پس از عمل جراحی سیر نزولی داشت نشانه بهبود بیماری و اگر سیر صعودی داشت نشانه عود بیماری می باشد (۶۵). علاوه براین به تازگی پدیده احتمالی آپوپتوزیس نیز به عنوان ایمنی ذاتی مطرح شده است. آپوپتوزیس یک مرگ برنامه ریزی شده بوده و توسط یک سری و قایع بیوشیمیایی و ساختاری از قبیل فشردن کروماتین، قطعه قطعه شده DNA، انجام می پذیرد و به عنوان یکی از مکانیسم های مهم دفاعی، در برابر عوامل بیماری زا محسوب می شود. این پدیده توسط یک سری پروتئازهای اختصاصی موسوم به کاسپازها فعال می شود و از دو مسیر میتوکندریایی (داخل سلولی) و رسپتور مرگ (خارج سلولی) رخ می دهد. تحقیقات صورت گرفته روی کیست هیداتید نشان می دهد که پروتئینهای شبیه به کاسپازها در لایه ژرمینال کیست هیداتید ظاهر می شود که باعث ناباروری کیستهای دختر می شود. به همین دلیل بررسی آپوپتوزیس در زمینه درمان و پیشگیری حائز اهمیت بوده و تاکنون واکسن کامل و مطمئنی علیه مرحله لاروی این انگل ساخته نشده است. به نحوی که با انتخاب مسیرهای آپوپتوتیکی دقیق و مهم، می توان داروهائی موثر با کارآیی بالا ساخت تا آپوپتوزیس را القاء نماید (۶۶-۶۸).

## ۲) مقاومت اکتسابی (ایمنی ثانویه):

### الف) ایمنی سلولار:

در بیماران هیدتیدوزی، لنفوسیت‌های T بیشتر از ایمنوگلوبین‌ها دارای اهمیت هستند. این لنفوسیت‌ها تحت عنوان سلول‌های امدادگر ۱ و ۲ (TH1, TH2) نامیده می‌شوند. سلول‌های TH1، اینترلوکین ۲، اینترفرون گاما و اینترفرون بتا و سلول‌های TH2، اینترلوکین‌های ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۳ را تولید می‌کنند. سلول‌های TH1، عمل‌کننده‌های اصلی سلول، علیه میکروب‌های داخل سلولی و واکنش‌های ازدیاد حساسیت تاخیری می‌باشند و سلول‌های TH2 در دفاع غیر وابسته به فاگوسیتی میزبان، دفاع علیه انگل‌های خاص و همچنین در پاسخ به آلرژن‌های محیطی و اتوزینوفیل‌ها شرکت می‌کنند. مانند سایر آلودگی‌های کرمی، اکینووکوس سبب تحریک سلول‌های TH1 و TH2 و سیتوکاین‌های مربوط به این دو دسته سلول می‌گردند. سلول‌های TH1 و TH2 روی یکدیگر اثر منفی دارند، چنانکه اینترفرون گاما ممانعت از پرولیفراسیون سلول‌های TH2 و اینترلوکین ۱۰ ممانعت از سنتز سیتوکاین‌های سلول‌های TH1 را باعث می‌شوند. در عفونت هیدتیدوز، هر دو جمعیت سلولی TH1 و TH2 به خوبی فعال بوده و معمولاً سه پاسخ تیپیک ایجاد می‌شود که عبارتند از: ۱- واکنش افزایش حساسیت فوری که محصول آن آنتی‌بادی‌های IgE و IgG می‌باشد. ۲- اتوزینوفیلی ۳- ماستوسیتوز. این پاسخ‌ها تحت کنترل سایتوکاین‌های تولید شده به وسیله دو دسته جداگانه از سلول‌های TH1 و TH2 هستند. اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما پاسخ‌های IgE، IgG4 را تنظیم می‌کنند، درحالی‌که اینترلوکین ۵، فاکتور تحریک ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها بوده و اینترلوکین ۳، پاسخ اتوزینوفیلها را تنظیم می‌کنند. اینترلوکین ۳ و ۴ پرولیفراسیون ماستوسیت‌ها و تمایز آنها را افزایش می‌دهند. مطالعه پاسخ‌های ایمنی در افراد مبتلا به بیماری‌های عفونی نشان می‌دهد که الگوی سایتوکاینی TH1، منعکس‌کننده مقاومت در برابر عفونت، در حالی‌که الگوی سایتوکاینی TH2 منعکس‌کننده الگوی بیماری است. عفونت‌های مزمن که توسط کرم‌ها ایجاد می‌شوند، به طور مداوم پاسخ‌هایی از نوع TH2 را ایجاد می‌کنند و می‌توانند باعث کاهش عملکرد سلول‌های TH1 و در نهایت باعث کاهش اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما شوند. در حال حاضر مشخص



شده که پاسخ های ایمنی پاتوژنیک و پاسخ های محافظت کننده نسبت به عفونت های انگلی، مربوط به فعال شدن زیر گروه های لنفوسیت های امدادگر TH1 و TH2 و در نهایت سایتوکاین های مختلف می باشد (۳۶،۱۴،۱۳).

#### ب) ایمنی همولار:

طبق بررسی های انجام شده، چهارماه پس از بلعیدن تخم انگل توسط گوسفند، ایمنی همورال و تولید آنتی بادی علیه شاخص های آنتی ژنیک انگل رخ می دهد. آنتی بادی های اختصاصی از کلاس های IgE، IgG، IgM و IgA می باشند ولی کلاس غالب IgG است. آنتی بادهای اختصاصی علیه آنتی ژن این انگل تا چند سال پس از بهبودی باقی می مانند. سن بیمار، برنامه درمان دارویی، جراحی قلبی، محل کیست، سالم ماندن کیست، موفولوژی کیست، استرین انگل متغیرهایی هستند که ممکن است بر پاسخ ایمنی همولار تاثیر گذار باشند. مطالعات اخیر نشان داده که مخلوطی از سلولهای عمل کننده و آنتی بادی لازم است که انگل های مهاجم را ریشه کن کند. لنفوسیت های Th2،Th1 نقش مهمی در پیامدهای بالینی بیماری از طریق تولیدات متنوع سابتوکینی ایفا می کنند. IgA ضد انکوسفر مانع نفوذ انگل به دیواره روده باریک می شود. در ۸۷ درصد بیماران هیداتیدوزی، پاسخ بیشتر از نوع IgG۴ می باشد که در میان سایر زیر کلاسها ی IgG، پاسخ غالب می باشد. دریک بررسی ۹۴ درصد بیماران هیداتیدی مورد مطالعه در سرم خود دارای آنتی بادی علیه Ag 5 و ۷۲ درصد دارای آنتی بادی علیه AgB بودند. اینترلوکین ۴ مترشح از لنفوسیت های TH2 باعث تغییر کلاس آنتی بادی به IgE و IgG ۴ در انسان می شود. در حالیکه از تمایز این سلولها به سلولهای TH1 ممانعت به عمل می آورد. اینترلوکین ۵ ترشح شده از لنفوسیت TH2 نیز عامل تحریک، تولید و فعالیت ائوزینوفیل ها می باشد. ائوزینوفیل ها به دلیل داشتن پروتئین<sup>۱</sup> (MBP) موجود در گرانول های خود باعث از بین بردن انگل ها می شوند. این پروتئین کریستالی خاصیت قلیائی داشته و دارای ویژگی های زیر می باشد:

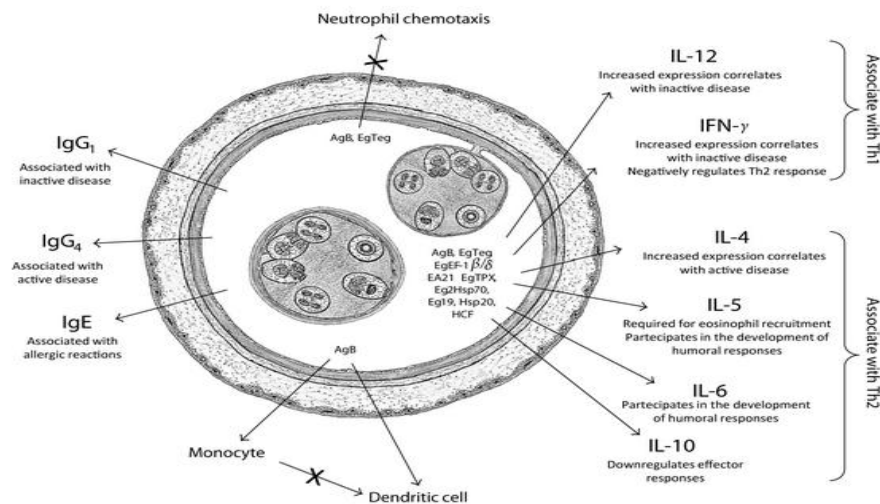
---

<sup>1</sup> Major Basic Protein

(۱) یک ماده سیتوتوکسیک برای کرمها محسوب می‌شود.

(۲) باعث آزاد سازی هیستامین از بازوفیل ها می‌شود.

(۳) باعث خنثی سازی هپارین مترشحه از بازوفیل ها و ماست سل‌ها می‌شود. همچنین IL5 قادر به تقویت بازوفیل ها جهت آزاد سازی محتویات گرانولی خود می‌باشد. IL5 به همراه  $(TGF-\beta)^1$  باعث تغییر کلاس آنتی بادی به IgA می‌شود. ایمونوگلوبین ها از طریق سیتوتوکسیسیته واسطه به سلول و وابسته به آنتی بادی  $(ADCC)^2$  که یک مکانیسم وابسته به TH2 بوده عمل می‌نمایند. در نهایت در بیماری های انگلی و آلرژیک میزان این دوایمونوگلوبین (IgE و IgG4) در سرم افزایش یافته و با ازدیاد ائوزینوفیلی در خون و بافت مواجه می‌شویم (۱۳، ۱۴، ۳۶).



تصویر ۴: پاسخ ایمنی در کیست هیداتید

<sup>1</sup> Tumor Growth Factor- $\beta$

<sup>2</sup> Antibody dependent cell mediated cytotoxicity

## آپوپتوزیس :

واژه آپوپتوزیس یک واژه یونانی و به معنی ریزش برگ درختان پائیزی است. در سال ۱۹۷۲ هنگامی که Kerr و همکارانش برای نخستین بار تفاوت میان نکروز و آپوپتوزیس را مشاهده کردند، گمان نمی‌بردند که پدیده اکتشافی آنها روزی سر لوحه مطالعه ضد سرطانی قرار گیرد (۶۶). آپوپتوزیس یکی از اصلی ترین راه های حذف سلول های ناخواسته است که در بدن موجودات پرسلولی و حتی تک سلولی انجام می شود (۶۹-۶۷). شکل گیری اندامها و بافتهای بدن انسان، در دوره جنینی و کنترل میزان رشد و تکثیر سلول های بدن، همگی از نتایج این پدیده زیستی است (۷۰). به عنوان مثال، وقوع پدیده آپوپتوزیس در سلول های جنین انسان، باعث جدا شدن انگشتان دست از هم می‌شود. به هم خوردن سرعت وقوع این پدیده چه به صورت افزایشی و چه کاهششی باعث ایجاد سرطان یا بیماری هایی نظیر آلزایمر و پارکینسون می گردد (۷۱،۷۲). شناسایی این فرایند سلولی و راه های کنترل آن در دست یابی به داده های ضد سرطانی و ضد التهابی راه گشا است (۷۳). مطالعات نشان داده اند هر عاملی ( مانند قرارگیری در معرض عوامل توکسیک یا انجماد ) از رشد و تکامل طبیعی سلولها جلوگیری کند، ممکن است زمینه را برای بروز آپوپتوزس در آنها فراهم کند (۷۴). آپوپتوزیس یک فرایند بیوشیمیایی هماهنگ است که به مرگ سلول منتهی می‌شود (۷۵،۷۶) و نقش کلیدی در تکامل سیستم ایمنی و زندگی طبیعی موجودات پرسلولی بازی می‌کند (۶۶). آپوپتوز یک رخداد طبیعی سلولی است که به کمک آن میزان رشد و تکثیر سلولهای بدن تنظیم و از ایجاد سلول های سرطانی جلوگیری می شود. در این فرایند، چون سلول مسئول مرگ خود می باشد، به آن خودکشی سلولی هم گفته می‌شود. سیستم ایمنی با به کارگیری فرایند مذکور، بسیاری از اعمال ضد آنتی ژنی خود را انجام می‌دهد. حذف سلول های آلوده، حذف کلون های T و B فعال شده بر علیه آنتی ژن های خودی و به طبع آن جلوگیری از بروز بیماری اتوایمیون، از نتایج به کارگیری فرایند آپوپتوزیس می باشند (۷۷).

در آپوپتوزیس تراکم کروماتین درون هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA به قطعه های ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت بازی و ایجاد حالت نردبانی در ژل الکتروفورز، از دست دادن چسبندگی سلول و تخریب اسکلت سلولی، انتقال فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشای سلولی، بالونی شدن سطح سلول و تولید اجسام آپوپتوزی صورت می گیرد. برخلاف آپوپتوزیس، نکروز، پاسخ طبیعی سلول به صدمات فیزیولوژیکی است که با بر هم خوردگی توانایی سلول برای نگه داری همئوستازی شروع می شود و با نفوذ آب و یونهای خارج سلولی، تمام اندامک های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم شده و با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می گیرد. در نهایت اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم های لیزوزومی، در مایع التهابی خارج سلولی رها می شوند. بنابراین مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده بافتی همراه می باشد (۷۷،۷۶). بنابراین در آپوپتوزیس بر خلاف نکروز، سلول خودکشی کرده و سریعاً توسط فاگوسیتها یا سلولهای اپی تلیال مجاور بدون اینکه پاسخ التهابی ایجاد کنند، شناسایی و هضم می شوند (۷۸،۷۳).

فرایند آپوپتوزیس همانند تمام مسیرهای سلولی، از مسیرهای مشخص و توسط تحریکهای خاص، القاء می شوند. این تحریک ها اغلب منشاء درون سلولی دارند و می توان آنها را به چهار دسته اصلی طبقه بندی کرد:

۱- تشعشع یا سموم.

۲- فقدان یا کمبود عوامل رشد یا هورمون ها.

۳- فعال شدن از مسیر اتصال لیگاند به گیرنده ( که از مهم ترین مسیرهای فعال سازی است).

۴- فعال سازی از طریق سلولهای ایمنی و سلولها T کشنده.

پیام مرگ از مسیرهای فوق به سلول ابلاغ و یاخته از طریق مسیر رسپتوری یا مسیر میتوکندریایی، آماده مرگ می شود ( ۸۰،۷۹).

## مولکول های تنظیم کننده آپوپتوزیس:

### (۱) پروتئین های خانواده مولکول 2 B-cell lymphoma (Bcl-2):

Bcl-2 یک پروتئین غشایی است که اساسا در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد و می تواند هم نقش القاء کننده و هم نقش مهار کننده آپوپتوزیس را داشته باشد (۸۱).

### (۲) کاسپازها:

اجرایی ترین عضو آپوپتوزیس هستند و نقش مهمی در پیشبرد مرگ سلولی دارند. کاسپازها را از نظر تقدم و تاخر و شرکت در فرایند مرگ سلولی، به دو دسته آغازگر (کاسپازهای ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲) و اجرایی (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) تقسیم می کنند. کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز ۸، در ابتدای فرایند، فعال می شوند، در صورتیکه کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز ۳ در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغازگر فعال می شوند و آبشار کاسپازی را به راه می اندازند (تصویر ۲) (۷۷).

### (۳) ممانعت کننده های کاسپازی:

این ممانعت کننده ها پروتئین هایی هستند که IAP<sup>۱</sup> نامیده می شوند. اتصال ممانعت کننده های مذکور به کاسپازها و مهار کنندگی آنها به وسیله نواحی BIR<sup>۲</sup> موجود در IAP رخ می دهد. نواحی BIR حفاظت شده است و ۷۰ اسید آمینه دارد که به صورت پشت سرهم در باکولو ویروسها تکرار می شوند. IAP از طریق رقابت با سوبسترا برای اتصال به کاسپازها موجب ممانعت و در نهایت تخریب کاسپازهای شرکت کننده در فرایند آپوپتوزیس می شوند. IAP در باکولو ویروسها با مهار کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ در سایتو مگالوویروسها با مهار کاسپاز ۸ ایفای نقش می کند (۷۷).

<sup>۱</sup> Inhibitor of apoptosis protein

<sup>۲</sup> baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat

#### ۴) مولکول P53:

مولکول P53 یکی از مهم ترین مهار کننده های چرخه تکثیر سلولی است و آنرا محافظ ژنوم می نامند که با القای آپوپتوزیس از ایجاد تومور جلوگیری می کند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است (۷۸).

#### مسیرهای مرگ سلولی:

بسته به این که پیام مرگ از چه طریقی به سلول ابلاغ شود، مسیر فعالسازی مرگ سلولی متفاوت است. اگر پیام ها داخلی باشند، اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود و اگر پیام از طریق رسپتورهای سطحی سلولی بیان شود، انتقال پیام از طریق مولکول های سازگار کننده آبشار کاسپازی خواهند رسید. میزان مرگ سلولی القاء شده توسط رسپتورها شدیدتر از مسیر میتوکندریایی است (۷۸).

#### مسیر رسپتوری:

رسپتورهای مرگ، رسپتورهای سطحی سلول هستند که پیام را از طریق لیگاندهای مخصوص انتقال می دهند و آبشار کاسپازی را فعال می کنند (۷۳). وقتی این رسپتورها به لیگاند خود متصل می شوند، مرگ سلولی اتفاق می افتد. تجزیه و تبدیل پرو کاسپاز ۸ به کاسپاز ۸ یا فرم فعال آن، باعث راه اندازی آبشار کاسپازی می شود. در مرحله بعد، کاسپاز اجرایی ۳ فعال شده و به نوبه خود باعث فعال سازی سایر کاسپازهای اجرایی و پیشرفت چرخه آپوپتوزیس می شود (۶۷).

#### مسیر میتوکندریایی:

میتوکندری به عنوان یکی از اصلی ترین اندامک های فعال در مسیر مرگ سلولی شناخته شده است. این اندامک ها با رهایی مولکول های فعال کننده مکانیسم خودکشی سلولی به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم در این فرایند شرکت می کنند. در پاسخ به سیگنال های مرگ سلولی، نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری سبب

آزاد شدن مولکول های پرو آپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز ( $AIF^1$ )، سیتوکروم C،  $Smac^2/DIBLO^3$  و اندونوکلئاز G از فضای بین دو غشاء میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می شوند.  $Smac/DIBLO$  اثر آنتاگونیستی روی مهارکنندهای کاسپاز دارد. سیتوکروم C هم طی مکانیسمی که کاملاً مشخص نیست باعث الیگومر شدن  $Apaf-1^4$  می شود و  $Apaf-1$  کاسپاز ۹ را فعال می کند و کاسپاز ۹ فعال، سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی از قبیل کاسپاز ۳ و ۷ می شود (۷۶).

نشانه اصلی آپوپتوزیس قطعه قطعه شدن DNA است (۷۹). بعد از تمامی تغییرات ذکر شده، سلول به اجسام وزیکول مانندی تقسیم می شود که هر کدام از آنها داری مقداری از محتویات سلولی هستند. سلول های مجاور یا فاگوسیت های حرفه ای بدون این که واکنش های التهابی سلولی را فعال سازند اجسام آپوپتوزی را به دام انداخته و هضم می کنند. بدین ترتیب سرنوشت یک سلول آپوپتوزی به پایان می رسد و این چرخه ادامه می یابد (۸۰، ۸۱).

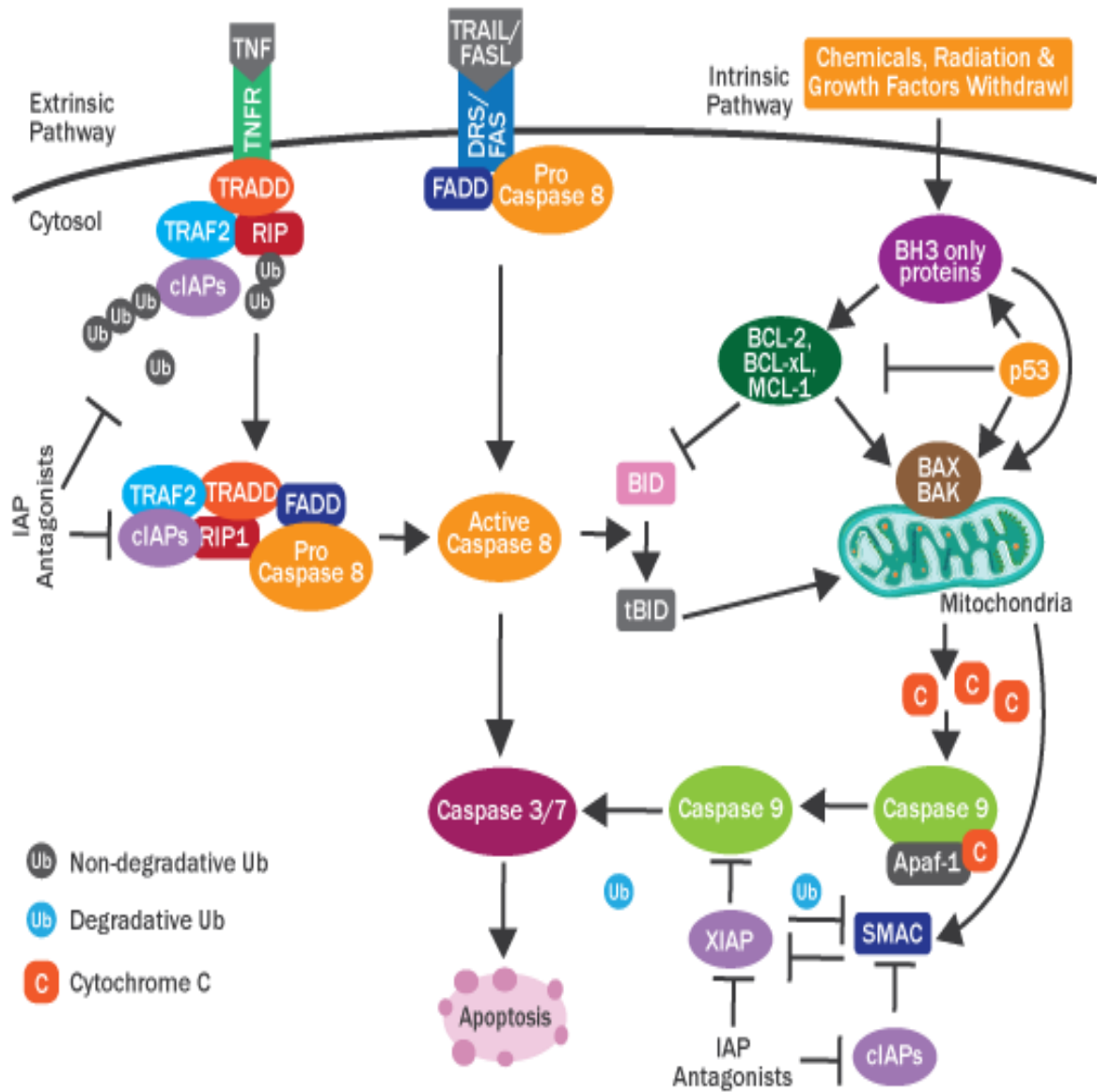
---

<sup>1</sup>- Apoptosis Inducing Factor

<sup>2</sup>- second mitochondria-derived activator of caspases

<sup>3</sup>- Direct IAP-binding protein with low pl.

<sup>4</sup>- Apoptotic protease activating factor 1



تصویر ۵: مسیر های مرگ سلولی



## بیان مساله:

هیداتیدوز یا اکینوкокوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و توسط فرم لاروی اکینوкокوس گرانولوسوس ایجاد می شود. این بیماری از نظر بهداشتی و اقتصادی حائز اهمیت بوده و می تواند به عنوان یک تهدید برای سلامتی باشد (۲،۱). اکینوкокوزیس در بسیاری از نقاط دنیا پراکندگی داشته و در کشورمان ایران بومی است. میزبانهای اصلی این انگل سگ سانان و میزبانهای واسط آن علفخواران می باشند. این بیماری در انسان، توسط جایگزینی فرم لاروی انگل در اندامهای مختلف از جنله کبد، ریه و مغز ایجاد می شود (۴-۱). با توجه به اینکه عمل جراحی موثرترین روش درمانی هیداتیدوز می باشد، لذا انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر قبل از عمل جراحی و تزریق آنها به داخل کیست ها خطر نشست پروتواسکولکس های زنده را کاهش داده و برای بسیاری از جراحان از اهمیت فراوانی برخوردار است (۷-۵). در حال حال حاضر استفاده از مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی به جهت عوارض جانبی آنها محدود شده و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۸،۹). چنانچه بعضی از آنها به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال گزارش شده اند ولی جهت اطمینان از بی ضرر بودن آنها تحقیقات بیشتر توسط محققین توصیه شده است (۸۲،۸۳،۸۴،۸۵). ایمنی ذاتی انسان بر علیه کیست هیداتید و لایه های آن بالاخص لایه ژرمینال، به عنوان یکی از مکانیسمهای احتمالی در سرکوب کیست هیداتید محسوب می شود (۱۰). اجزای مهم سلولی ایمنی ذاتی، نوتروفیل، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها، فیبرو بلاستها و جز پنجم مسیر آلترناتیو کمپلمان می باشد (۸۶). از مسیر های جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتید، اینفلازوم، تول لایک رسپتور ها و آپوپتوزیس می باشد (۸۷،۸۸). که اخیرا آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است. این روش یکی از بهترین روش در از بین بردن انگلهای اکینوкокوس می تواند باشد (۱۱). آپوپتوزیس مرگ برنامه ریزی شده است که توسط یکسری مکانیسم های بیو شیمیایی، مرفولوژیکی از قبیل فشردن کروماتین، قطعه قطعه شدن، تولید اجسام آپوپتوتیکی و بیان مولکولهای آپوپتوتیک داخل سلولی و خارج سلولی انجام می پذیرد (۸۹،۹۰،۹۱). آپوپتوزیس عمدتا از دو مسیر خارج

سلولی متعلق به رسپتور مرگ و مسیر داخل سلولی میتوکندریایی انجام می گیرد (۹۲). گیرنده های مرگ، اعضای خانواده گیرنده فاکتور TNF می باشند و وقتی این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القای آپوپتوزیس می گردد (۹۳) مرگ برنامه ریزی شده در طول تکامل نرمال موجودات در بسیاری از پستانداران اتفاق می افتد. مرگ سلولی در دوران رشد و نمو جنینی و تشکیل موفقیت آمیز ارگانها، یک امر اساسی است (۹۴، ۹۵). آپوپتوزیس در بسیاری از بی مهرگان از جمله نماتودها، ترماتودها، بند پایان و سستودها از جمله کیست هیداتید گزارش شده است (۹۶-۹۹).

با توجه به اینکه اثرات اسکولیسیدال عصاره گیاهان کاکوتی، مورد، سرخارگل و کافور توسط مجریان این طرح شناسایی شده ولی مکانیسم اثر داروهای مذکور که در سرنوشت بیمار می تواند تاثیر داشته باشد هنوز مشخص نشده، لذا برانیم تا در تحقیق حاضر احتمال القاء آپوپتوزیس توسط گیاهان مذکور بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک را مورد بررسی قرار دهیم.

## فصل دوم

### مروری بر متون



تصویر ۶: گیاه سرخارگل

**سرخارگل (Echinacea)** یک گیاه علفی چند ساله و دارای ریزوم کوتاه، ریشه مستقیم و کم و بیش منشعب، به رنگ قهوه ای تیره تا سفید مات است. ساقه این گیاه قائم و استوانه ای شکل بوده و رنگ آن به علت وجود آنتوسیانین (Anthocyanin)، به رنگ های سبز روشن، آبی و یا حتی قرمز می باشد. سرخارگل از خانواده آستراسه آ (Asteraceae) و از تیره کاسنی بوده و در این تیره، گیاهان مختلفی از جمله بومادران، کاسنی، گل آفتاب گردان، بابونه رومی، درمنه و غیره وجود دارد. جنس *Echinacea* شامل ۹ گونه است که مهمترین گونه های آن *Echinacea angustifolia*، *Echinacea pallida* و *Echinacea purpurea* می باشد که کاربرد درمانی دارند. سرشاخه های هوایی گیاه سرخارگل سرشار از آلکامیدها، پلی ساکاریدها، اسید های کافئیک<sup>۱</sup>، شیکوریک<sup>۱</sup>، کافتاریک<sup>۲</sup> و به میزان کم اسیدکلروژنیک<sup>۳</sup> می باشد. گیاه

---

1 Caffeic Acid

سرخارگل از دیرباز مورد توجه بوده و در طب سنتی کاربرد داشته است. بذر گیاه مذکور اولین بار در سال ۱۳۷۲ از مجارستان به ایران آورده شد. در سال های اخیر توجه محققین به این گیاه بیشتر شده و تحقیقات انجام گرفته نشان دهنده اثرات بسیار خوب گیاه مذکور روی سیستم ایمنی بوده که می تواند باعث تقویت آن شده و مقاومت بدن در برابر بیماریها را افزایش دهد. این گیاه صد ها سال است که به عنوان گیاه دارویی در درمان سرماخوردگی، برونشیت و عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی و برخی التهاب ها استفاده می شود (۱۰۰، ۱۰۱). همچنین اثرات ضد باکتریایی (۱۰۲، ۱۰۳)، ضد ویروسی (۱۰۴)، ضد قارچی ( ۱۰۵) و ضد انگلی از جمله اسکولیسیدالی عصاره گیاه سرخارگل، توسط محققین مختلف گزارش شده است ( ۱۰۸-۱۰۶).

---

1 Chichoric Acid  
2Chaftaric Acid  
3Chlorogenic Acid

چنانکه Driggins و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه *E. purpurea* بر روی سلول های NK<sup>۱</sup> (اولین سلول های دفاعی در برابر سرطان) و سلولهای سرطانی پستان موش (BT-549) (در شرایط برون تنی را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق فوق سلول های مورد نظر با عصاره خام ریشه گیاه سرخارگل با غلظتهای ۷۰-۱۷۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  در مدت زمان ۴ روز انکوبه شدند و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولهای مورد آزمایش دریافتند که گیاه مذکور میزان سلولهای NK را افزایش و رشد سلولهای بدخیم را کاهش داده است و همچنین در این تحقیق دریافتند که عصاره خام ریشه گیاه سرخارگل می تواند در سلولهای سرطانی پستان موش (BT-549) آپوپتوزیس ایجاد کند که این اثر با غلظت عصاره گیاه ارتباط مستقیم داشت (۱۰۹).

Chica و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی اثر سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره هگزانی ریشه سه گیاه از سرخارگل با گونه های (*E. purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*) بر روی رده های سلولهای سرطانی پانکراس (MIA PaCa-2) و کولون (COLO320) نشان دادند که هر سه گونه توانایی زنده ماندن سلول های سرطانی را به روش وابسته به زمان و غلظت، کاهش دادند. در این تحقیق گزارش کردند که گونه *E. pallida* با LC50 ۴۶ میکروگرم در میلی لیتر در سرطان پانکراس و با LC50 ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر در سرطان کولون، فعالترین گونه در کاهش سلولهای سرطانی مذکور بود و اعلام نمودند که عصاره گیاه مذکور با افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ و قطعه قطعه کردن DNA در هسته، اثر آپوپتوتیک بر روی سلولهای مورد مطالعه داشت (۱۱۰). همچنین در بررسی دیگری، محققین فوق جهت مشخص کردن اثر آپوپتوتیک ترکیبات پلی استیلن و پلین های جدا شده از ریشه گیاه *E. pallida* بر روی سلول های سرطانی پانکراس (MIA PaCa-2) و کولون (COLO320) به این نتیجه رسیدند که فعالیت آپوپتوزی ترکیبات

---

1Natural killer cell

فوق از گیاه مذکور، بصورت وابسته به غلظت و زمان، بر روی سلولهای سرطان کولون و پانکراس تاثیر داشته و باعث افزایش قابل توجه فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ و القاء آپوپتوزیس بر روی سلولهای سرطانی فوق بودند (۱۱۱).

Tsai و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر سیتوتوکسیک عصاره گیاه *E. purpurea* و شیکوریک اسید بر روی سلولهای سرطانی رحم (HCT-116) و کولون (Caco-2 cell) انسان را بررسی کردند. در تحقیق مذکور، سلولهای مورد نظر، با  $0 - 2000 \mu\text{g/ml}$  از عصاره اتانولی گیاه فوق و همچنین  $0 - 200 \mu\text{g/ml}$  اسید شیکوریک، در مدت زمان ۴۸-۲۴ ساعت، انکوبه شدند و نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه مذکور و اسید شیکوریک به ترتیب در غلظت های  $100 - 2000 \mu\text{g/ml}$  و  $50 - 200 \mu\text{g/ml}$  توانستند، در مدت زمان ۴۸ ساعت باعث کاهش عملکرد آنزیم تلومراز (آنزیم ویژه همانند سازی)، کاهش عملکرد سلول، افزایش معنی دار کاسپاز ۹، افزایش قطعات DNA و در نتیجه باعث القای آپوپتوزیس در سلولهای مذکور شوند که تمام این تاثیرات وابسته به دوز و زمان بود (۱۱۲).

Zitkevicius و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر عصاره گیاه *E. purpurea* بر روی فعالیت میتوزی و آپوپتوزی سلولهای کبدی و کلیه موش آلوده شده با کادمیوم (آلاینده مهم صنعتی) را مورد بررسی قرار دادند. این محققین ابتدا عوارض ناشی از کادمیوم که عبات از آپوپتوزیس، فعالیت میتوزی سلولها و مرگ نکروتیک می باشد را ایجاد نمودند، سپس با مواجه ساختن آنها با عصاره گیاه فوق، اثر عصاره گیاه مذکور بر روی عوارض ایجاد شده فوق را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه فوق فعالیت میتوزی ایجاد شده با کادمیم را کاهش و فعالیت آپوپتوزی آن را افزایش دادند و همچنین اعلام نمودند که مواجهه طولانی مدت سلولها با کادمیوم باعث تشکیل کانون نکروزی در کبد شده و استفاده از عصاره گیاه مورد آزمایش می تواند باعث کم شدن کانون مورد نظر شود و این اثرات را وابسته به دوز گزارش کردند (۱۱۳).

An و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر آپوپتوتیک عصاره گل مینا (یکی از گیاهان هم خانواده سرخارگل) بر روی سلولهای سرطان سینه (MDA-MB-231 and SK-BR-3) و معده (AGS) انسان را مورد

بررسی قرار دادند. محققین فوق نشان دادند که عصاره گیاه مذکور می تواند از طریق کاهش در بیان Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوزیس) و افزایش بیان Bax و P53 (القاء کننده های آپوپتوزیس) باعث مهار رشد سلولهای مذکور و ایجاد آپوپتوزیس در آنها نماید (۱۱۴).

Singh و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثر سیتوتوکسیک Artemisinin ( ماده گرفته شده از گیاه *Artemisia annua* ) ( یکی از گیاهان هم خانواده سرخارگل ) بر روی سلولهای سرطانی 4 – molt ( سلولهای بدخیم رده لنفوئیدی) موش را در شرایط برون تنی، بررسی نمودند. در تحقیق مذکور، سلولهای سرطانی با  $\mu\text{M}$  ۲۰۰ از ماده فوق در مدت زمانهای ۸،۴،۲،۱ ساعت انکوبه شدند و نکروز یا آپوپتوزیس ایجاد شده در سلولهای مذکور را با روش DNA Diffusion بررسی کردند. در تحقیق فوق نشان داده شد که آرتمیسین با غلظت مذکور توانست به مقدار قابل توجهی تعداد سلولهای سرطانی را کاهش داده و القاء آپوپتوزیس در سلول های مذکور را افزایش دهد. در بررسی فوق هیچ سلول نکروتیکی مشاهده نشد. تغییرات ایجاد شده با مدت زمان مواجهه سلولها ارتباط مستقیم داشت (۱۱۵).

همچنین یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر آپوپتوتیک داروی ضد مالاریای Artemisinin بر روی اریتروسیت ها را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که داروی مذکور با ایجاد اختلال در بیوسنتز هم، می تواند از هر دو مسیر میتوکندریایی و رسپتوری، در اریتروسیتها ایجاد آپوپتوریز نماید. همچنین در تحقیق فوق، افزایش فعالیت کاسپاز های ۸ و ۹ به صورت معنی داری گزارش گردید (۱۱۶).

Fullerton و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی اثرسیتوتوکسیک و آپوپتوتیک بتاگلوکان (یک نوع پلی ساکارید موجود در ساختمان قارچهای خوراکی) با غلظت و مدت زمانهای مواجهه مختلف بر روی سلولهای سرطان پروستات (PC-3) انسان در شرایط برون تنی، به این نتیجه رسیدند که بیشترین درصد از مرگ سلولی توسط بتاگلوکان، در غلظت  $480 \text{ mg/ml}$  و در مدت زمان ۲۴ ساعت اتفاق افتاد و گزارش نمودند که آپوپتوزیس ایجاد شده در سلولهای سرطانی پروستات انسان، وابسته به غلظت و زمان مواجهه بود (۱۱۷).

Chang و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی اثر آپوپتوتیک اسید کافئیک گرفته شده از گیاه *Ocimum gratissimum* Linn بر روی سلولهای سرطانی سرویکس رحم در انسان، جهت مشخص کردن مسیر مرگ سلولی، به این نتیجه رسیدند که اسید کافئیک موجود در گیاه مذکور می تواند بوسیله کاهش فعالیت Bcl-2 (مهار کننده آپوپتوزیس) و آزادسازی سیتوکروم C و همچنین افزایش معنی دار فعالیت کاسپاز ۳، از طریق مسیر میتوکندریایی، در سلولهای سرطانی سرویکس رحم انسان، ایجاد آپوپتوزیس نماید. همچنین محققین فوق اثرات مذکور را وابسته به دوز و زمان گزارش کردند (۱۱۸).

Xiao و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر آپوپتوتیک اسید شیکوریک بر روی سلولهای چربی 3T3-11 را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که ماده مذکور با اختلال تنظیم Bax (القاء کننده آپوپتوزیس) و Bcl-2 (مهار کننده آپوپتوزیس) و آزادسازی سیتوکروم C و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ می تواند باعث ایجاد آپوپتوزیس وابسته به میتوکندری شود (۱۱۹).

علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه Kang و همکاران در سال ۲۰۰۸، اثر آپوپتوتیک ناشی از  $H_2O_2$  بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید را گزارش کردند و نشان دادند که ماده شیمیایی مذکور می تواند باعث افزایش فعالیت کاسپاز های ۱ و ۳ و مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردد (۱۲۰) همچنین محققین فوق در سال ۲۰۰۹ نیز، القاء آپوپتوزیس توسط دو ماده دگزامتازون و ATP، بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق فوق، پروتواسکولکس ها را در چهار گروه جداگانه و به ترتیب با ATP، دگزامتازون، دگزامتازون + ATP و همچنین محیط کشت RPMI 1640 به عنوان کنترل منفی مجاور کردند و گزارش نمودند که مواد شیمیایی فوق در ۲ گروه دگزامتازون و دگزامتازون + ATP باعث تغییرات مرفولوژیک پروتواسکولکس های کیست هیداتید از جمله کاهش حجم سلولی، حجیم شدن سیتوپلاسم، متورم شدن غشاء سلولی، افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و در نهایت القاء آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های مذکور



شدند و اثرات فوق در گروه دگزامتازون + ATP را بیشتر از گروه دگزامتازون گزارش کردند (۱۲۱). همچنین در تحقیقات دیگر نیز بیان مولکولهای القاء کننده آپوپتوزیس در کیستهای نابارور در مقایسه با کیست های بارور و بافت سالم ( ۱۲۲) و اثر آپوپتوتیک برخی گیاهان دارویی (۱۲۳) و داروهای ضد انگلی (۱۲،۱۲۴) بر روی پروتواسکولکس ها گزارش شده است.

## فصل سوم

### اهداف و فرضیات

#### هدف اصلی:

تعیین اثر آپوتوتیک گیاه دارویی سرخار گل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

#### اهداف فرعی:

- تعیین اثر آپوتوتیک رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۷ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

#### اهداف کاربردی :

شناسایی داروهای گیاهی با غلظت های مشخص که به روش آپپتوزیس سبب مرگ پروتواسکولکس ها شده و بتوانند در آینده بعنوان یک دارو با عوارض کمتر استفاده شوند.

### فرضیه ها یا سؤال های پژوهش:

- رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک دارای اثر آپوپتوتیک است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است .

- رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است .

- رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل بر تولید کاسپاز ۷ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است .

جدول متغیرها:

جدول ۱:

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
ویابیلیتی کیست های هیداتیک		✓			✓		زنده ماندن پروتواسکولکس ها در لوله های حاوی نمونه های مورد آزمایش	رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری با اٲوزین ۱/۰٪
اثر عصاره گیاه دارویی	✓				✓		اثر گذاری عصاره گیاهان دارویی روی پروتواسکولکس ها	دارد / ندارد
کاسپاز		✓	✓				مقدار ماده تولید شده در مایع رویی حاصل از کشت سلولی	میکرومول
مرگ آپوپتوز		✓	✓				مقدار درصد مرگ پروتواسکولکس	درصد

نوع مطالعه:

پایه - تجربی

بررسی های آماری :

داده های جمع آوری شده توسط نرم افزار آماری SPSS آنالیز و با استفاده از جداول و نمودارهای مناسب نمایش داده شده و سپس با آزمون های آماری t-test ، آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری آزمون ها ۵٪ در نظر گرفته شد.

## فصل چهارم

### مواد و روش ها

#### تجهیزات مورد نیاز :

۱- سمپلر متغیر ۵-۱۰ لاندا

۲- سمپلر متغیر ۱۰-۱۰۰ لاندا

۳- سمپلر متغیر ۱۰۰-۱۰۰۰ لاندا

۴- پنس

۵- قیچی

۶- اسکالپل

۷- سانتریفیوژ

۸- میکروسانتریفیوژ

۹- ترازوی دیجیتال

۱۰- انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪  $\text{CO}_2$

۱۱- اتوکلاو

۱۲- الایزا ریدر با طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر

۱۳- PH متر

۱۴- تایمر

۱۵- هود

#### وسایل مصرفی :

۱- پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه ته صاف

۲- پلیت الایزا

۳- سرنگ ۵ و ۱۰ سی سی

۴- لام

۵- لامل

۶- لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ سی سی

۷- پيپت پاستور

۸- ميكروتيوب در سايزهاى مختلف

۹- سر سمپلر زرد

۱۰- سر سمپلر آبی

۱۱- سر سمپلر كريستالی

۱۲- بر چسب

۱۳- دستکش لاتكس

۱۴- دستکش يكبار مصرف

### محلول ها و مواد مصرفی :

۱- جنتا مایسین

۲- بافر PBS با PH ۷/۴ - ۷/۲ (  $\text{NaCl}$  8gr,  $\text{KCL}$  0.2 gr , 1.150 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 gr )

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  مواد فوق در مقداری آب مقطر حل شده و در نهایت به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سپس PH

آن با PH متر تنظیم شده و اتوکلاو گردید . پس از خارج کردن از اتوکلاو و خنک نمودن آن، مقدار ۱ میلی

لیتر جنتا مایسین به آن اضافه شد.

۳- الکل ۷۰ درجه

۴- عصاره گیاه دارویی سرخارگل

۵- سرم فیزیولوژی

۶- بافر (Merk) DMSO

کیت های مورد نیاز :

۱- کیت مرگ سلولی Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche)

۲- کیت کاسپاز ۳ Caspase 3 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۳- کیت کاسپاز ۸ Caspase 8 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۴- کیت کاسپاز ۹ Caspase 9 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۵- کیت اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد (Biotek)

۶- محیط کشت سلولی RPMI 1640 (Gibco)

روش کار :

تهیه عصاره گیاهی :

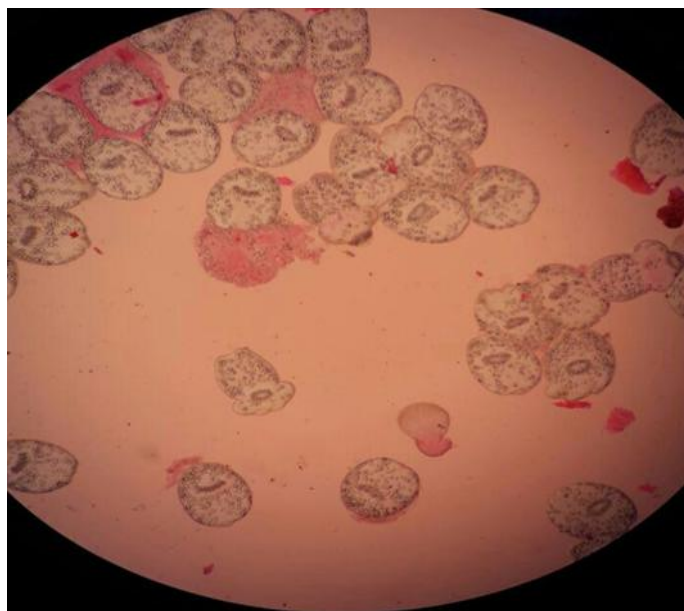
عصاره گیاه سرخارگل توسط متخصص گیاه شناسی از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی کرج شناسایی و جمع آوری شد. یک نمونه از گیاه، در پژوهشکده ثبت و نگهداری و بقیه در سایه خشک شد. برای تهیه عصاره پس از خشک کردن و آسیاب کردن گیاه (مقدار نیم کیلوگرم) ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری انجام شد. این عمل سه بار تکرار و سپس عصاره حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردید و میزان عصاره خشک شده محاسبه و در ظروف پلیت دردار، در داخل یخچال تا هنگام آزمایش نگهداری شد (۱۲۵).

## تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها :

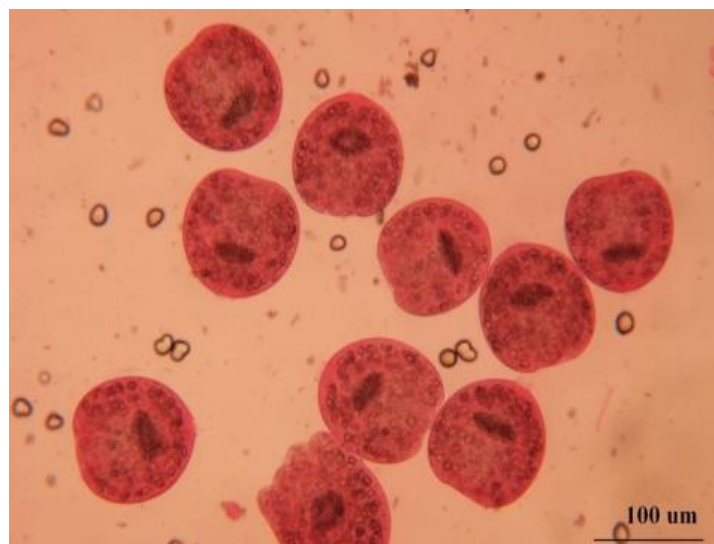
کبد و ریه های آلوده به کیست هیداتید، از کشتارگاه قزوین تهیه و به بخش انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند. سطوح خارجی کیست ها با محلول بتادین و الکل ۷۰ درجه ضد عفونی شده و با رعایت شرایط استریل، محتویات کیست ها با سرنگ تخلیه و در زیر هود، در لوله های فالكون استریل ریخته شد. سپس با تیغ اسکالپل استریل، جدار کیست ها پاره شده و پروتواسکولکس ها کاملاً جمع آوری و به لوله ها اضافه شد. برای اطمینان از مناسب بودن نمونه های بدست آمده، پس از سانتریفیوژ آنها، از رسوب حاصله که حاوی پروتواسکولکس ها بود، مقداری برداشته و پس از رنگ آمیزی با ائوزین ۰/۱ درصد در زیر میکروسکوپ، پروتواسکولکس هایی که *Viability* آنها بالای ۹۰٪ بود، جهت آزمایش انتخاب شدند (۱۲۶، ۱۲۷).

پروتواسکولکس های جمع آوری شده، با محلول PBS حاوی جنتا مایسین، ۳ بار شستشو داده شده و رسوب حاصله وارد لوله های فالكون استریل حاوی ۵ میلی لیتر PBS گردیده و به یخچال منتقل شدند. جهت بررسی آپتوزیس و اندازه گیری کاسپاز ها در نمونه های جمع آوری شده، تعداد پروتواسکولکس ها در حجم معین PBS، مشخص گردید. جهت این کار پس از مخلوط کردن کامل پروتواسکولکس ها، مقدار ۲۰۰ لاندا از آن برداشته و در یک میکروتیوب ریخته شد و پس از Spin کردن کامل محتویات میکروتیوب مذکور، مقدار ۲۰ لاندا از آن روی لام گذاشته شده و پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. در نهایت تعداد کل پروتواسکولکس ها در حجم نهایی محاسبه و برای مراحل بعدی آزمایش، در یخچال قرارداده شد.





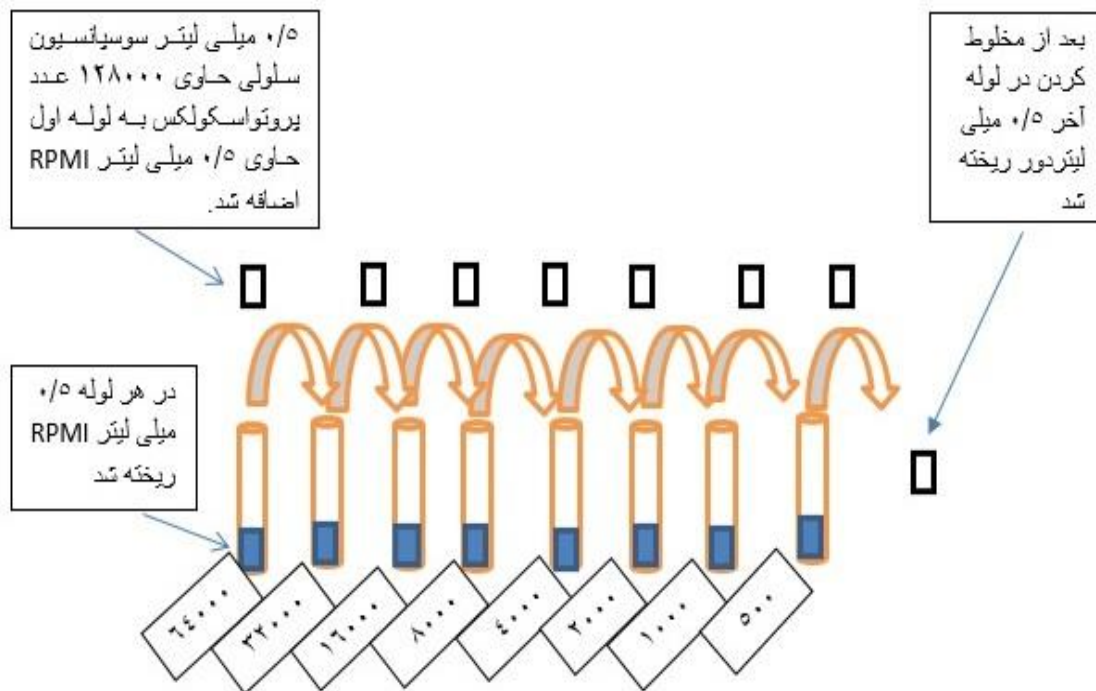
تصویر ۷: پروتواسکولکس های زنده اکینوکوکوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل



تصویر ۸: پروتواسکولکس های مرده اکینوکوکوس گرانولوزوس بعد از مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل

### تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه سرخارگل:

بر اساس دستورالعمل کیت اندازه گیری کاسپاز های ۳، ۸ و ۹، لازم بود تعداد مناسب پروتواسکولکس ها، جهت مجاور کردن با عصاره گیاه سرخارگل و همچنین مقدار پروتئین نمونه های نهایی مورد آزمایش، مشخص شود. طبق دستورالعمل مذکور، میزان پروتئین قابل اندازه گیری، بین  $200 - 50 \mu g$  و تعداد مناسب سلول های مورد استفاده،  $10^6 \times 5-1$  توصیه شده است. به علت بزرگ بودن پروتواسکولکس ها، باید تعداد آنها طوری در نظر گرفته می شد که در نهایت میزان پروتئین نمونه های بدست آمده از لیز آنها توسط بافر لیز کننده بین  $200 - 50 \mu g$  باشد. لذا برای بدست آوردن این تعداد، رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها به ترتیب به تعداد ۶۴۰۰۰، ۳۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰ با RPMI تهیه شد. جهت این کار ۸ لوله انتخاب و در همه لوله ها مقدار  $0.5 ml$  RPMI ریخته شد. سپس  $0.5 ml$  از سوسپانسیون پروتواسکولکس ها که حاوی ۱۲۸۰۰۰ پروتواسکولکس در میلی لیتر بود به لوله اول اضافه گردید. بعد از مخلوط کردن،  $0.5 ml$  از آن به لوله بعدی منتقل شده و این کار تا لوله آخر ادامه یافت. در نهایت  $0.5 ml$  از لوله آخر بیرون ریخته شد (تصویر ۹). در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از رقت های مذکور با ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه سرخارگل با موثرترین غلظت که در تحقیقات قبلی مشخص شده  $5 mg/ml$  (۱۰۶، ۱۰۷، ۱۰۸)، مجاور گردید و تحت شرایط مورد اشاره در کیت های فوق الذکر (دمای ۳۷ درجه، با حضور  $Co_2$  و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، محتویات میکروتیوب ها (سوسپانسیون پروتواسکولکس ها و عصاره گیاه) به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $g$  ۲۰۰ سانتریفیوژ شدند و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس های رسوب کرده سه بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملاً از محیط خارج شود. سپس به رسوب پروتواسکولکس ها بافر لیز کننده اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. در ادامه، مجدداً با شرایط فوق، سانتریفیوژ تکرار و محلول رویی جدا و لیبل گذاری شد. جهت تعیین میزان پروتئین نمونه های مذکور از روش براد فورد استفاده شد.



تصویر ۹: روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها

تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد:

کیت اندازه گیری پروتئین، حاوی آلبومین سرم گاو<sup>۱</sup> با غلظت ۵ mg/ml به عنوان استاندارد ذخیره و محلول برادفورد بود. جهت رسم منحنی استاندارد، ابتدا استاندارد ذخیره (آلبومین) به نسبت ۱:۱۰ با PBS رقیق و غلظت ۵۰۰ µg/ml تهیه گردید. سپس ۸ لوله آزمایش انتخاب و به هریک مطابق (جدول ۲) مقادیری از محلول استاندارد رقیق شده، محلول رقیق کننده و معرف براد فورد اضافه گردید تا غلظت های ۰ ، ۲۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۳۰۰ ، ۴۰۰ و ۵۰۰ از استاندارد تهیه شود. در نهایت ۸ لوله نیز جهت رقت های تهیه شده از محلول رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها در نظر گرفته شد. به این لوله ها ۲۰ لانداسوسپانسیون حاصل از لیز پروتواسکولکس ها و ۲۰۰ لاندای محلول براد فورد اضافه گردید (جدول ۳) و بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری لوله ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

---

<sup>1</sup>- BSA : Bovine serum albumin

جدول ۲: محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد

Number of Tube solutions solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA ST <sup>1</sup> (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
Diluent <sup>2</sup> (μL)	20	19	18	16	12	8	4	0
Bradford solution (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentration (μg/ml)	0	25	50	100	200	300	400	500

1. Bovine serum albumin standard

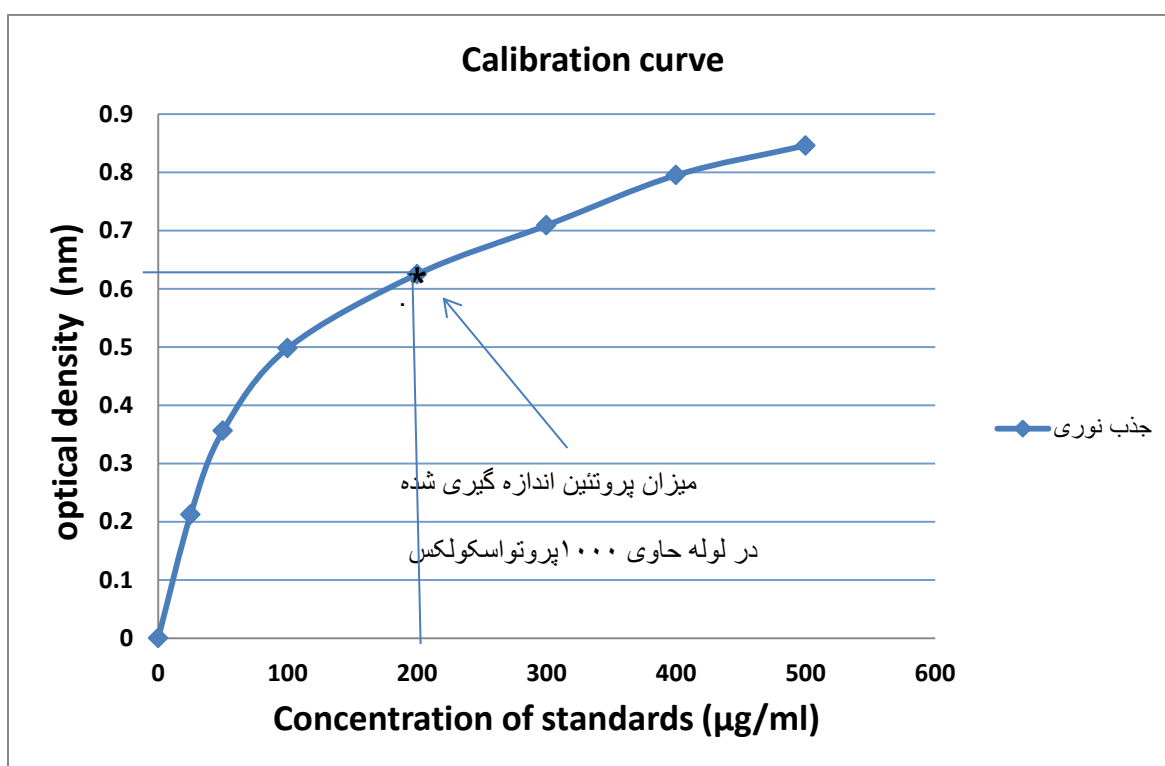
2. PBS buffer or normal saline

جدول ۳: محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها

Number of Tube solutions	1	2	3	4	5	6	7	8
Sample (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20
Bradford solution (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Number of protoscolices	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
Optical density (595 nm)	0.324	0.619	0.859	1.04	1.95	>2	>2	>2
Concentration(μg/ml)	42	200	495	>500	>500	>500	>500	>500

بعد از خواندن جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها، منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم و جذب نوری نمونه ها با منحنی استاندارد مقایسه گردید. تعداد مناسب پروتواسکولکس ها که بعد از انکوباسیون، باعث آزاد شدن حدود ۲۰۰ میکروگرم پروتئین شده بود، ۱۰۰۰ عدد در میلی لیتر بدست آمد ( منحنی ۱).

منحنی ۱: منحنی کالیبراسیون تست براد فورد و مقایسه جذب نوری supernatant حاصل از پروتواسکولکس ها با جذب نوری استانداردها



تهیه رقت های ۵ mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره گیاه دارویی سرخارگل :

ابتدا مقدار ۰/۸ گرم از عصاره گیاه دارویی سرخارگل با ترازوی دیجیتال (با دقت ۴ رقم اعشار) وزن و در ۰/۵ میلی لیتر محلول DMSO حل گردید. بعد از حل شدن کامل عصاره، حجم محلول با سرم فیزیولوژی استریل به ۲ ml رسانده شد تا غلظت ۴۰۰ mg/ml بدست آید. سپس رقت های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ از رقت مذکور تهیه گردید. (با توجه به اینکه رقت های تهیه شده مجددا توسط سوسپانسیون پروتواسکولکس ها به میزان ۱/۲ رقیق می شوند، لذا یک رقت بالاتر تهیه گردید).

**روش انجام آزمایش آپتوزیس بر اساس کیت : Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche)**  
**محتویات کیت (Kit Contents)**

ویال / بطری رنگ	برچسب	محتویات / کاربرد
۱ قرمز	Anti-Histone-Biotin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone H11-4)</li> <li>• کونژوگه شده با بیوتین</li> <li>• لیوفلیزه</li> <li>• پایدار</li> <li>• جهت متصل شدن به اجزای هیستون و تشکیل کمپلکس ایمنی با بیوتین در میکروپلیت</li> </ul>
۲ سفید	Anti-DNA-POD <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone MCA-33)</li> <li>• کونژوگه شده با پراکسیداز</li> <li>• لیوفلیزه</li> <li>• پایدار</li> <li>• جهت متصل شدن به قطعات DNA و ایجاد واکنش رنگی با سبوسترای ABTS</li> </ul>
۳ آبی	Positive Control	<ul style="list-style-type: none"> <li>• کمپلکس DNA-Histone</li> <li>• لیوفلیزه</li> <li>• پایدار</li> </ul>
۴ سبز	بافر انکوباسیون	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۱۰۰ میلی لیتر</li> <li>• آماده مصرف</li> </ul>
۵ قرمز	بافر لیز کننده	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۱۰۰ میلی لیتر</li> <li>• آماده مصرف</li> </ul>

<sup>1-</sup> Anti-DNA Peroxidase



<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۱۵ میلی لیتر</li> <li>• آماده مصرف</li> <li>• برای حل کردن قرص های ABTS</li> </ul>	بافر سبوسترا	۶ بی رنگ
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۳ قرص</li> <li>• هر کدام برای تهیه ۵ میلی لیتر محلول سبوسترا</li> </ul>	سبوسترای آنزیم پراکسیداز ABTS <sup>۱</sup> Substrate Tablet	۷ سفید
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۱۰۰ میلی لیتر</li> <li>• جهت متوقف کردن واکنش رنگی سبوسترای ABTS</li> </ul>	محلول متوقف کننده ABTS	۸ بی رنگ
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۱۲ ردیف میکروپلیت ( هر کدام حاوی ۸ چاهک)</li> <li>• کوت شده با استرپتو آویدین</li> </ul>	میکروپلیت	۹
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ۴ ورق چسب پوشاننده</li> <li>• جهت پوشاندن میکرو پلیت</li> </ul>	چسب برای پوشاندن میکروپلیت	۱۰

<sup>۱</sup>- ABTS Tablets are used as substrates in enzyme immunoassays with horseradish peroxidase as a marker enzyme

- ۱- پودر لیوفلیزه Anti- Histone Biotin با در قرمز (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone H11-4 که با بیوتین کونژوگه شده).
- ۲- پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone MCA-33 که با پراکسیداز کونژوگه شده).
- ۳- کنترل مثبت
- ۴- محلول انکوباسیون ( Incubation Buffer )
- ۵- محلول لیز کننده (Lysis Buffer)
- ۶- محلول سوبسترا ( Substrate Buffer )
- ۷- ABTS Tablets سوبسترای آنزیم پراکسیداز که به صورت قرص در کیت تعبیه شده است و در هنگام آزمایش باید در ۵ میلی لیتر محلول سوبسترا حل شود .
- ۸- محلول متوقف کننده ( ABTS Stop Solution )
- ۹- میکروپلیت
- ۱۰- چسب برای پوشاندن میکروپلیت

### آماده کردن محلول های کار ( Working solutions )

شرایط نگهداری	مورد استفاده	آماده سازی	(ویال) محتویات
در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.	قسمتی از محلول ایمنی	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	Anti-Histone Biotin(۱)
در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.	قسمتی از محلول ایمنی	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	Anti-DNA POD(۲)
در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است.	ELISA مرحله ۱	در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد.	Positive Control(۳)
۱ ماه دور از نور و دمای ۲ تا ۸ درجه پایدار است.	ELISA مرحله ۵	هر قرص ABTS در ۵ml محلول سوپسترا (ویال ۶) حل شد	ABTS Tablets(۷)
در دمای ۲ تا ۸ درجه قبل از تاریخ مصرف، پایدار است.	ELISA مرحله ۶	آماده مصرف (در صورت کدر بودن باید در ۳۷ درجه قرار گیرد).	ABTS Stop Solution (۸)

۱- Anti-Histone Biotin ( پودر لیوفلیزه آنتی هیستون بیوتین + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۲- Anti-DNA POD (پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۳- Positive Control (پودر لیوفلیزه کنترل مثبت + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

مواد فوق ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شدند.

۴- محلول ABTS ( بسته به تعداد نمونه ها هر قرص ABTS در ۵ ml محلول سوبسترا حل شد. پایداری این محلول در تاریکی ۱ ماه است ).

۵- محلول ایمنی (Immunoreagent): ( ۱ حجم Anti-DNA POD + ۱ حجم Anti-Histone Biotin + ۱۸ حجم از محلول انکوباسیون) این محلول باید تازه تهیه شود.

۶- کنترل منفی : از پروتواسکولکس های بدون مواجهه با دارو بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

۷- نمونه مورد آزمایش : از فراکشن های سیتو پلاسمیک ناشی از لیز پروتواسکولکس ها بعد از مواجهه با گیاه دارویی سرخارگل استفاده گردید. برای تهیه این فراکشن ها، تعداد پروتواسکولکس ها در لوله فالكونی که از قبل تهیه شده بود، شمارش شد و به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. به طوریکه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰ عدد پروتواسکولکس بود. تعداد ۱۰ عدد میکروتیوب برای ۳ رقت از دارو و کنترل ها لیبل گذاری شد. سپس در همه آنها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروتواسکولکس آماده شده، ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ لاندا از رقت های تهیه شده گیاه دارویی سرخارگل و کنترل مثبت اضافه شد. در کنترل منفی ۱۰۰ لاندا محیط کشت RPMI اضافه گردید. میکروتیوب ها کاملاً مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و در مجاورت ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. بعد از این مرحله میکروتیوب ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملاً از محیط خارج شود سپس مقدار ۲۰۰ لاندا Lysis Buffer به رسوب باقیمانده، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوبه شدند. در مرحله بعد مجدداً سانتریفیوژ بعمل آمده و محلول رویی در

میکروتیوب های مشخص شده برای آزمایش الایزا جدا شدند. این نمونه ها پایداری کمی داشته، لذا در هنگام آزمایش در یخ قرار گرفته و سریعاً طبق مراحل زیر آزمایش شدند.



تصویر ۱۰: کیت تشخیص مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche)

## روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپوپتوزیس:

- ۱- ۲۰ لانداز نمونه های آماده شده از مرحله قبل و همچنین ۲۰ لانداز کنترل مثبت و منفی در چاهک های میکروپلیت الایزا ریخته شد.
  - ۲- سپس ۸۰ لانداز Immunoreagent آماده، به آن اضافه گردید. روی میکروپلیت با برچسب مخصوص پوشانده شده و روی شیکر با ۳۰۰ دور در دقیقه، برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.
  - ۳- بعد از پایان انکوباسیون، محلول رویی تخلیه و ۳ مرتبه با محلول شماره ۴ شستشو داده شد.
  - ۴- ۱۰۰ لانداز محلول ABTS به چاهک ها اضافه شده و میکروپلیت، روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، در این مرحله تغییر رنگ در چاهک ها مخصوصا در چاهک کنترل مثبت مشاهده شد. در یک چاهک، فقط ۱۰۰ لانداز محلول ABTS بعنوان بلانک ریخته شد.
  - ۵- ۱۰۰ لانداز محلول متوقف کننده ABTS به چاهک ها اضافه شد.
  - ۶- سپس جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد.
- \* تمام مراحل فوق ۳ بار در زمان های مختلف و هر بار به صورت دو تایی تکرار و نتایج ثبت گردید.

روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ بر اساس کیت های شرکت *abcam*  
محتویات کیت ها و آماده کردن محلول ها :

۱- Cell Lysis Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۲- Reaction Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۳- سوسترای اختصاصی کاسپاز ها : که در دمای ۲۰- سانتی گراد پایدار بوده و در موقع آزمایش Aliquot  
گرفته و به اندازه مصرف برداشته شد و بقیه مجدداً به فریزر برگردانده شد.

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۳ (DEVD-p-NA<sup>۱</sup>)

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۸ (IEHD-p-NA<sup>۲</sup>)

- سوسترای اختصاصی کاسپاز ۹ (LEHD-p-NA<sup>۳</sup>)

۴- DTT<sup>۴</sup> ۱مولار: که بعد از باز شدن کیت، به مقدار ۱۰ لاندا در هر میکروتیوب Aliquot شد و بقیه مجدداً  
به فریزر ۲۰- درجه منتقل گردید.

۵- Dilution buffer : آماده مصرف بوده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد پایدار است.

اصول اندازه گیری در کیت های مذکور مشابه بوده و بر اساس خاصیت پروتئازی کاسپاز ها استوار است به  
طوری که هر کاسپاز فقط می تواند ماده پارا نیتروآنیلین را از سوسترای اختصاصی خود جدا کند. پارا  
نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰ یا ۴۰۵ نانومتر دارای جذب نوری است و افزایش جذب نوری در مقابل کنترل  
منفی نشان دهنده افزایش فعالیت کاسپاز می باشد. برای اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها، مراحل تهیه نمونه ها  
همانند روش آپوپتوزیس انجام گردید. اما به علت نیاز به مقادیر بیشتری از نمونه حاصل از لیز پروتواسکولکس  
ها، حجم سوسپانسیون سلولی و رقت های مختلف گیاه دارویی سرخارگل به همان نسبت بیشتر در نظر گرفته  
شد. یعنی ۵۰۰ لاندا از سوسپانسیون پروتواسکولکس که حاوی ۵۰۰۰ سلول بود با ۵۰۰ لاندا از رقت های

<sup>1</sup>- Asp / D, Glu / E, Val / V, Asp / D amino acids attached to Para-nitroanilin

<sup>1</sup>- Ile / I, Glu / E, Thr / T, Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

<sup>3</sup>- Leu / L, Glu / E, His / H, Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

<sup>4</sup>- Dithiothreitol (Reducing agent)

مختلف گیاه دارویی سرخارگل مجاور شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪  $\text{CO}_2$  قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، مراحل آزمایش به شرح زیر و بر اساس دستورالعمل کیت ادامه پیدا کرد:

۱- بعد از پایان انکوباسیون، میکروتیوب ها با RCF، ۲۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با PBS شستشو گردید، سپس ۵۰ لاندا بافر لیز کننده سرد روی آنها اضافه شده و بعد از مخلوط کردن، ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند.

۲- بعدا با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد.

۳- بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی سریعاً جدا شده و در یخ قرار داده شد.

۴- تعداد ۱۰ چاهک الایزا انتخاب و لیل گذاری گردید. سپس ۵۰ لاندا از نمونه های بدست آمده و کنترل منفی به صورت دو تایی داخل آنها ریخته شد. برای حذف رنگ زمینه، در یک چاهک ۵۰ لاندا Reaction Buffer اضافه گردید.

۵- مقدار مورد نیاز محلول واکنش (Reaction Mix)، به نسبت ۵۰ لاندا Reaction Buffer و ۰/۵ لاندا DTT در نظر گرفته شد.

۶- ۵۰ لاندا از محلول آزمایش (Reaction Mix)، در هر چاهک ریخته شد.

۷- ۵ لاندا از سوپسترای اختصاصی هر کاسپاز به چاهک ها اضافه شد.

۸- پس از مخلوط کردن محتویات چاهک ها، چاهک ها ی مذکور به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند.

۹- در نهایت، نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر الایزا قرائت و نتایج مذکور ثبت گردید.



## ASSAY SUMMARY خلاصه اندازه گیری

فعال شدن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در نمونه ها ( Induce caspase3,8 & 9 activation in test sample )



آماده کردن نمونه ها ( Sample preparation )



اضافه کردن محلول واکنش و سوبسترای اختصاصی هر کاسپاز

Caspase 3 : Add 2X reaction buffer/DTT and DEVD-pNA

Caspase 8 : Add 2X reaction buffer/DTT and IETD-pNA

Caspase 9 : Add 2X reaction buffer/DTT and LEHD-p-NA



۱-۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ( Incubate 37°C for 1 – 2 hours )



اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۴۰۰-۴۰۵ نانومتر ( Measure optical density (OD400 nm) )

## فصل پنجم

### یافته ها

در این مطالعه اثر آپوپتوتیک گیاه سرخارگل با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بررسی شد. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید، مورد بررسی قرار گرفت. از سوسپانسیون حاوی پروتواسکولکس ها در محیط کشت RPMI و بدون مواجهه با عصاره گیاه، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمایش ۳ بار و هر بار به صورت دوتایی تکرار شد. نتایج در جداول ۴ تا ۷ و نمودار های ۱ تا ۸ خلاصه شده است.

چنانکه در جدول ۴ مشخص است، گیاه سرخارگل در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپوپتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ و به ترتیب به میزان ۳۶/۳۰ و ۴۶/۰۹ در صد معنی دار بود ( $P < 0.05$ ).

همچنین نمودار های ۱ و ۲ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های مواجه شده با رقت های مذکور (۵۰ و ۱۰۰) از عصاره سرخارگل را تایید می کند ( $P < 0.05$ ).

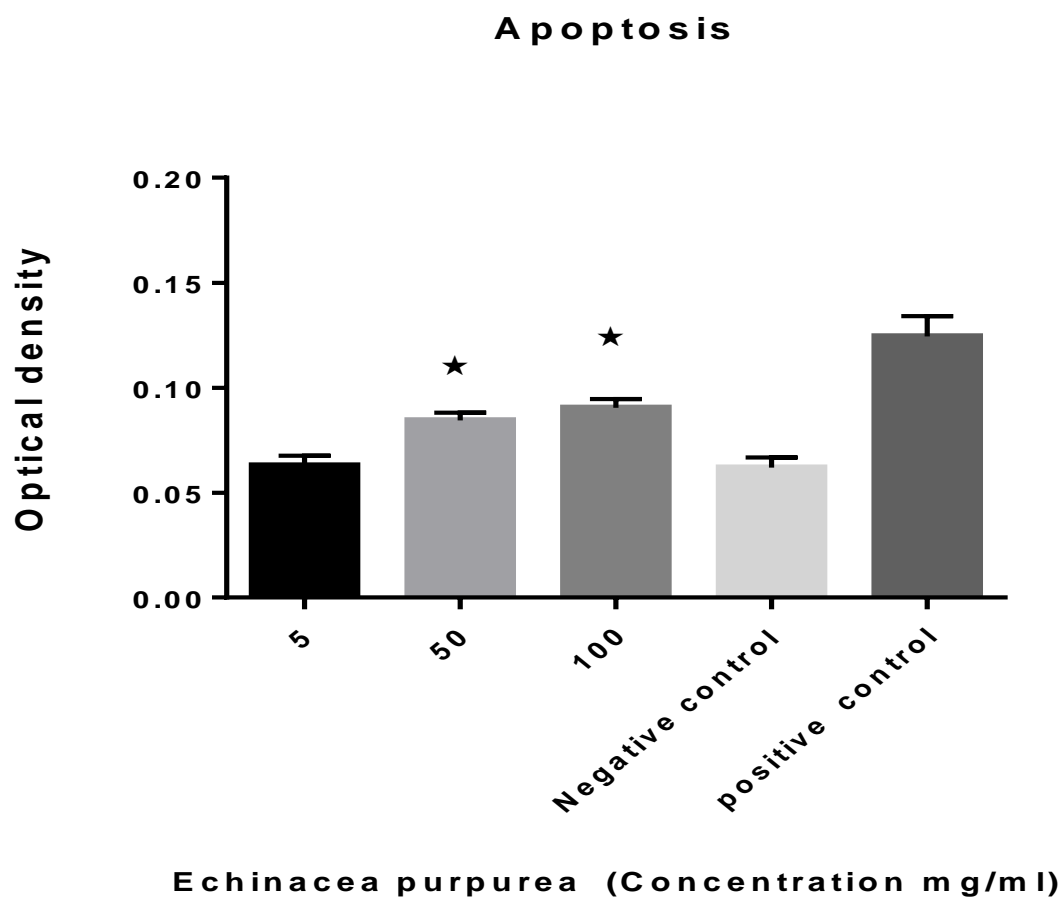
جدول ۴ : اثر آپویتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

غلظت عصاره (mg/ml)	تعداد تست	انحراف معیار (SD) $\pm$ میانگین جذب نوری	درصد آپیتوز
۵	۶	$0.06298 \pm 0.004566$	۱/۶۱
۵۰	۶	$0.08436 \pm 0.003744$	۳۶/۳۰*
۱۰۰	۶	$0.09036 \pm 0.004169$	۴۶/۰۹*
N.C <sup>1</sup>	۶	$0.06200 \pm 0.004696$	۱
P.C <sup>2</sup>	۶	$0.1244 \pm 0.009687$	۱۰۰

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

2- Positive control (Available in kit)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )



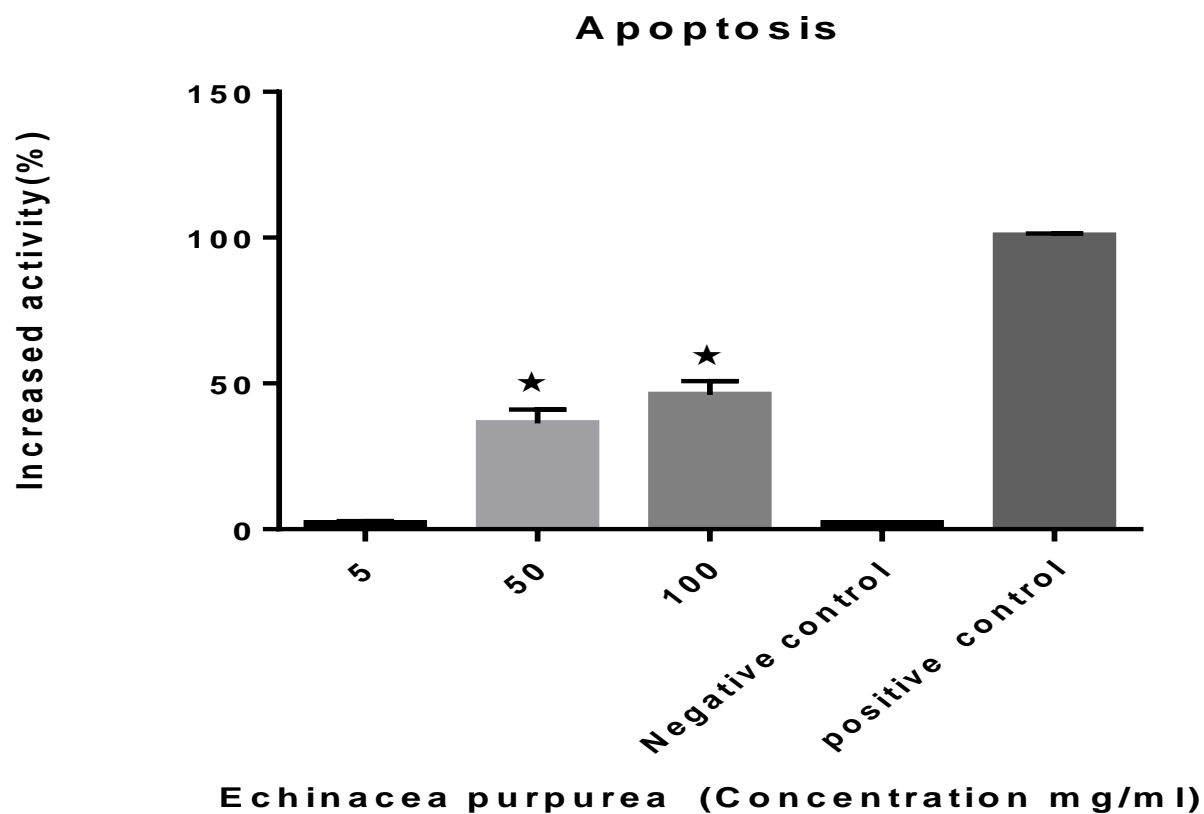
N.C: Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

P.c: Positive control (Available in kit)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۱: اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بر اساس میزان

جذب نوری نمونه ها در مقایسه با کنترل منفی



N.C : Negative control (Protoscolices without exposure to the extract))

P.C : Positive control (Available in kit)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۲: اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مقایسه با کنترل

منفی بر حسب درصد

در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه سرخارگل ( ۵ ، ۵۰ و ۱۰۰) در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر عصاره گیاه مذکور ، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز ۳ در تمام غلظت های مورد استفاده از گیاه فوق، افزایش یافت که این افزایش فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ به ترتیب با ۴۱/۸۰ و ۵۸/۶۰ درصد معنی دار بود (  $P < 0.05$  ) (جدول ۵).

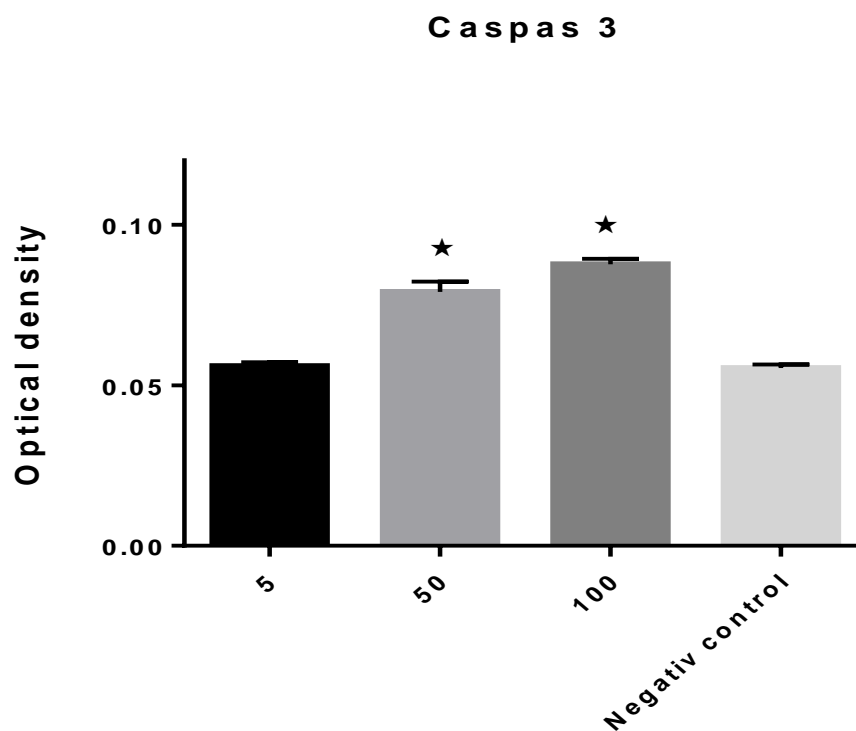
همچنین نمودار های ۳ و ۴ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های مواجه شده با رقت های مذکور ( ۵۰ mg/ml و ۱۰۰) از عصاره گیاه سرخارگل را تایید می کند (  $P < 0.05$  ).

جدول ۵ : اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳

درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۳	انحراف معیار (SD) $\pm$ میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
۱/۲۵	$0.0559 \pm 0.00115$	۶	۵
۴۱/۸۰*	$0.07903 \pm 0.003206$	۶	۵۰
۵۸/۶۰*	$0.08766 \pm 0.001686$	۶	۱۰۰
۱	$0.0553 \pm 0.00117$	۶	N.C <sup>1</sup>

1- Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control (p<0.05)



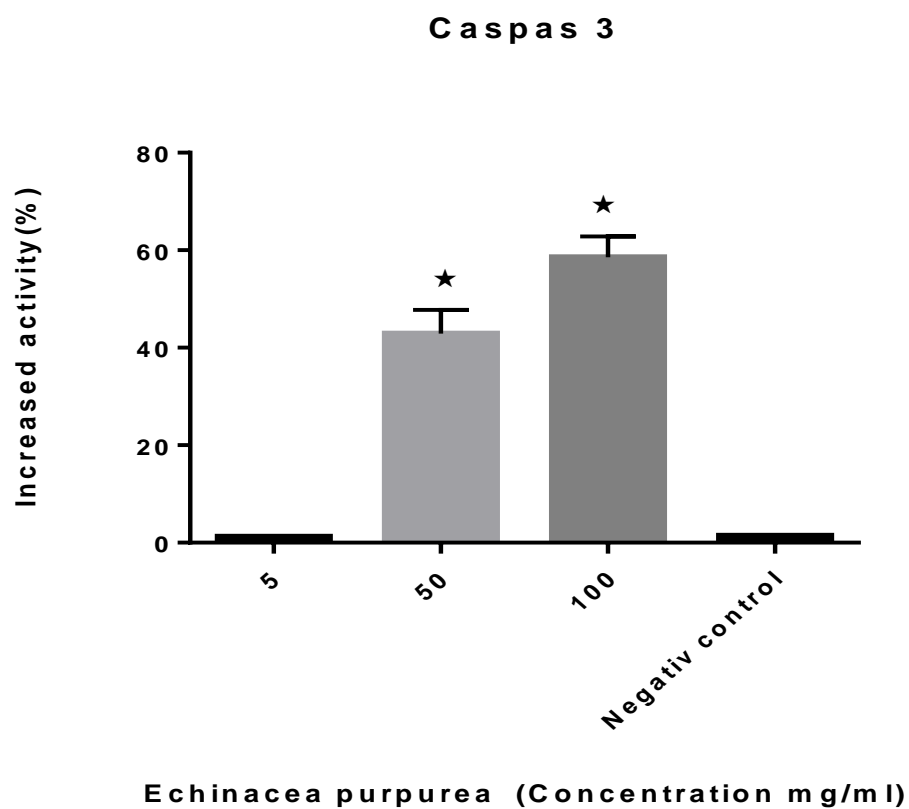
**Echinacea purpurea (Concentration mg/ml)**

1- Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۳: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر

حسب جذب نوری



1- Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۴: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳

برحسب درصد



فعالیت کاسپاز ۹ در اثر تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها، باز افزایش داشت که این اثر، فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml و در مقایسه با کنترل منفی، به ترتیب با ۱۱/۱۴ و ۴۸/۴۰ درصد، معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۶).

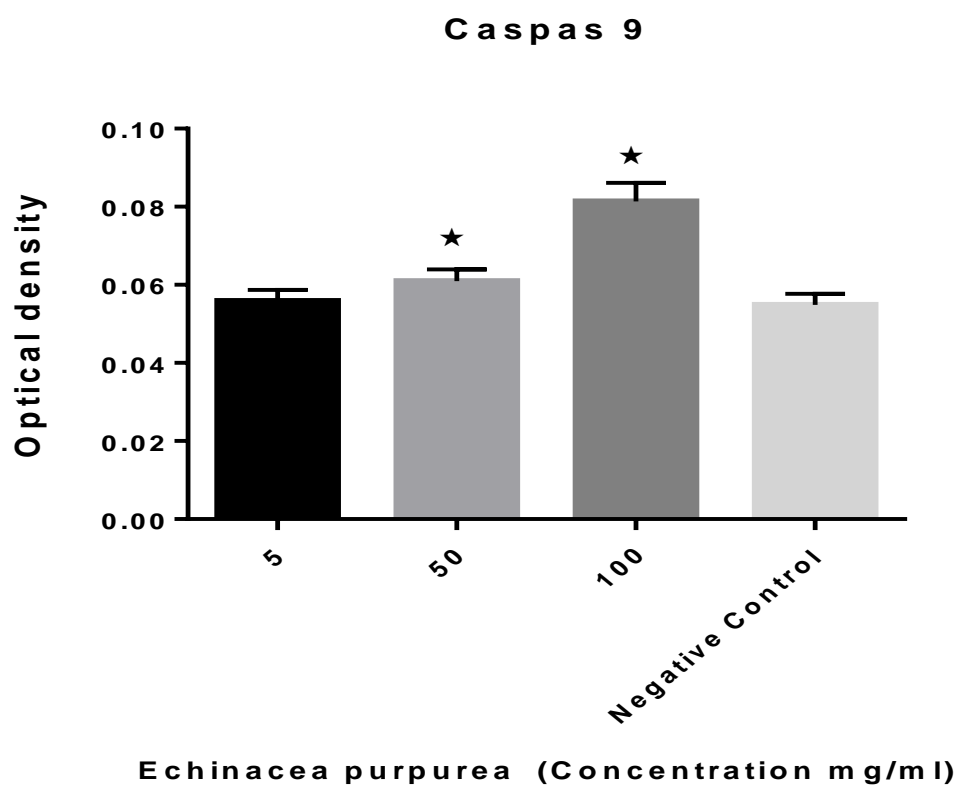
نمودار های ۵ و ۶ نیز نشان می دهد که افزایش جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس ها ی مواجه شده با عصاره گیاه سرخارگل، فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml معنی دار بود ( $P < 0.05$ ).

جدول ۶: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، درافزایش فعالیت کاسپاز ۹

درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۹	انحراف معیار (SD) $\pm$ میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
۱/۸۶	$0.0028 \pm 0.558$	۶	۵
۱۱/۱۴ *	$0.0028 \pm 0.609$	۶	۵۰
۴۸/۴۰ *	$0.0030 \pm 0.81$	۶	۱۰۰
۱	$0.0047 \pm 0.54$	۶	N.C <sup>1</sup>

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

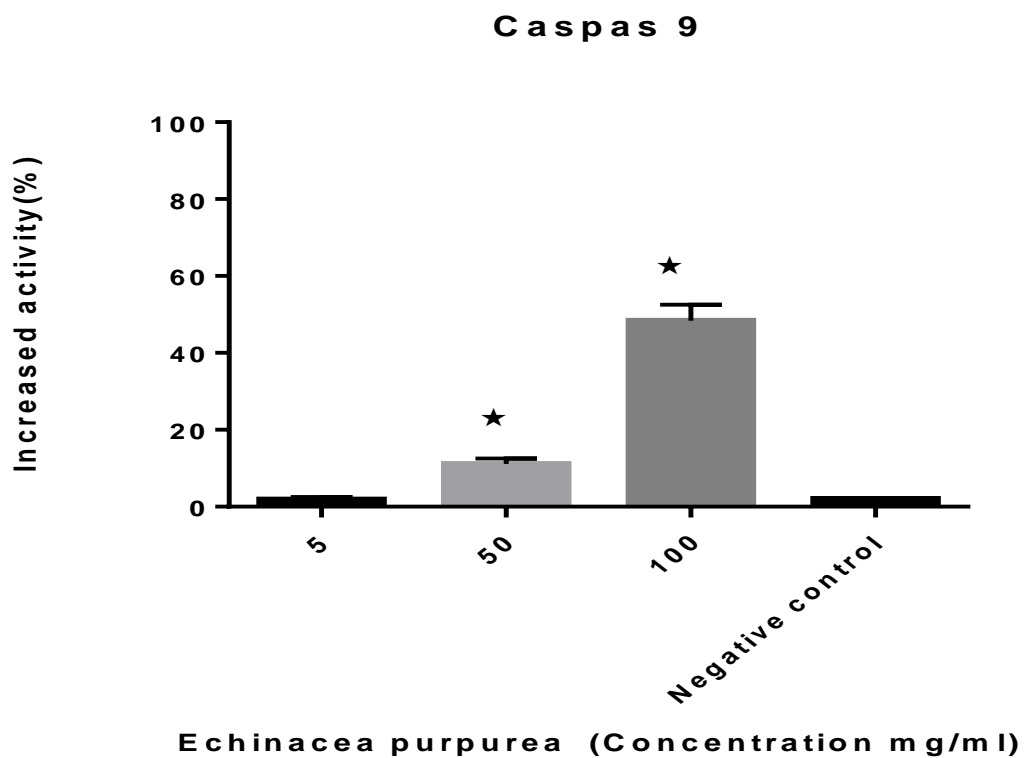


1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۵: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر

حسب جذب نوری



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\*Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۶: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر

حسب درصد

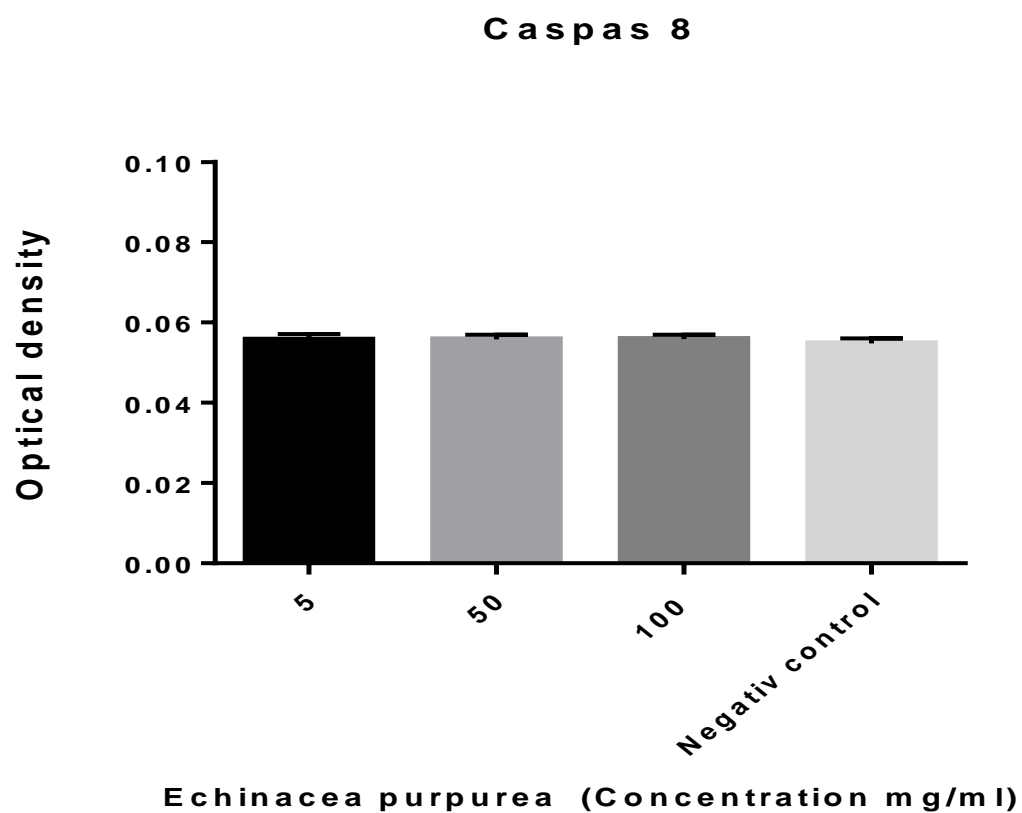
در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه سرخارگل (5 mg/ml، 50 و 100) بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، برای بررسی افزایش فعالیت کاسپاز 8، هیچکدام از غلظت های مذکور ، افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز 8 ایجاد نکردند (جدول 7) . این وضعیت همچنین در برحسب تغییرات جذب نوری و تغییر درصد فعالیت کاسپاز 8 به ترتیب در نمودار های 7 و 8 نشان داده شده است.

جدول 7: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز 8

درصدافزایش فعالیت کاسپاز 8	انحراف معیار (SD) $\pm$ میانگین جذب نوری	تعداد تست	غلظت عصاره (mg/ml)
1/70	$0.001405 \pm 0.0557$	6	5
1/86	$0.00112 \pm 0.0558$	6	50
2	$0.001102 \pm 0.0559$	6	100
1	$0.001258 \pm 0.0478$	6	N.C <sup>1</sup>

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control (p<0.05)

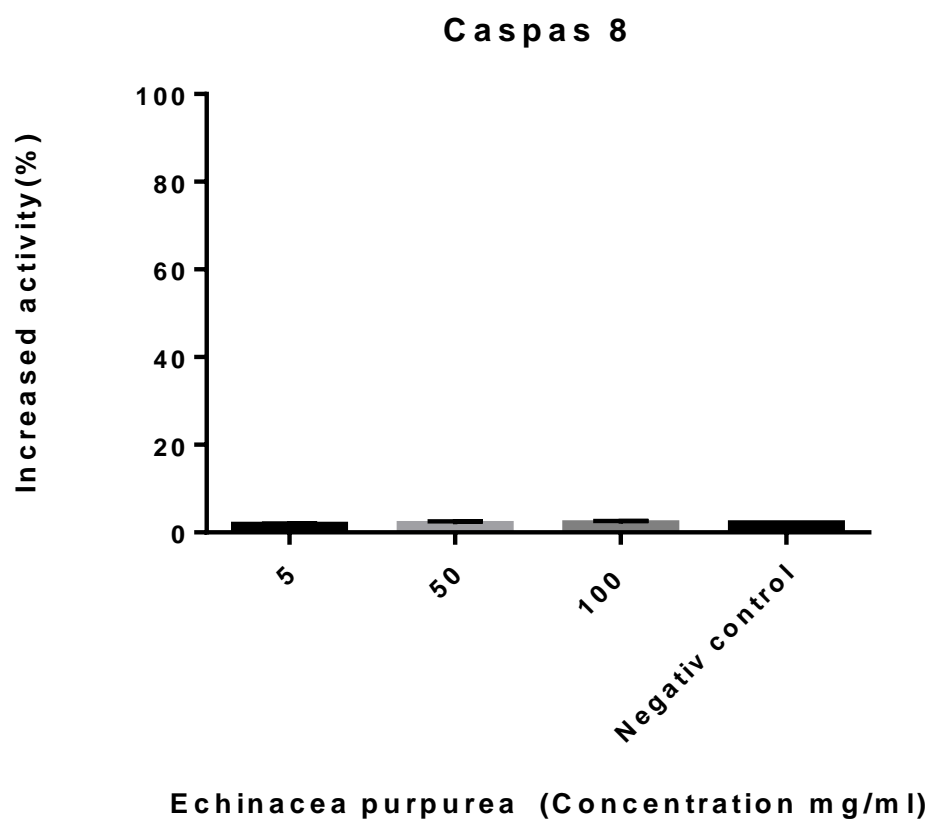


1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\*Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۷: اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر

حسب جذب نوری



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

\* Compared with negative control ( $p < 0.05$ )

نمودار ۸ : اثر عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸

بر حسب درصد

با استفاده از تست Tukey اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف گیاه سرخارگل ( ۵، ۵۰، ۱۰۰ ) و همچنین اثر مقایسه ای غلظت های مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتید مواجه شده با گیاه فوق، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که جداول ۹ تا ۱۲ نشان می دهند، وقتی اثر هر کدام از غلظت ها در القاء آپوتوزیس و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز های مورد مطالعه، از پروتواسکولکس ها مقایسه شد، ۱ تا ۴ گروه همگنی مشاهده شدند که این گروه ها ارتباطشان با همدیگر معنی دار نبوده ولی در ارتباط با گروه های دیگر معنی دار بود.

جدول ۸ : اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ )	
		1	2
Neg.control	6	.062	.084367  .090367
5	6	.062983	
50	6		
100	6		
P-value			.061

جدول ۹ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ )			
		1	2	3	4
Neg.control	6	.0543			
5	6		.0559		
50	6			.0790	
100	6				.0876
P.value		1.000	1.000	1.000	1.000



جدول ۱۰ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹، با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ )		
		1	2	3
Neg.control	6	.05483		
5	6		.05585	
50	6		.06093	
100	6			.08136
P.value		1.000	.071	1.000

جدول ۱۱: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸، با استفاده از تست Tukey

غلظت (mg/ml)	تعداد تست	گروه های همگنی در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ )
		1
Neg.control	6	.0548
5	6	.055733
50	6	.055800
100	6	.055883
P.value		0.975

## فصل ششم

### بحث

در این مطالعه اثر آپوتوتیک گیاه سرخارگل با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، بررسی گردید. گیاه سرخارگل در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپوتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس ها، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ در تمام غلظت های مورد استفاده از گیاه، افزایش یافت که این افزایش فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). لازم به یادآوری است که هیچکدام از غلظتهای مورد استفاده از عصاره گیاه سرخارگل افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکردند.

Driggins و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات ضد سرطانی عصاره گیاه *E. purpurea* بر روی سلول های NK (اولین سلول های دفاعی در برابر سرطان) و سلولهای سرطانی پستان موش (BT-549) در شرایط برون تنی را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق مذکور سلول های مورد نظر با عصاره خام ریشه گیاه سرخارگل با غلظتهای ۷۰-۱۷۵۰  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  در مدت زمان ۴ روز انکوبه شدند و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولهای مورد آزمایش دریافتند که گیاه مذکور میزان سلولهای NK را افزایش و رشد سلولهای بدخیم را کاهش داده است و همچنین در این تحقیق دریافتند که عصاره خام ریشه گیاه سرخارگل می تواند در سلولهای سرطانی پستان موش (BT-549) آپوتوزیس ایجاد کند که این اثر با غلظت عصاره گیاه ارتباط مستقیم داشت (۱۰۹). در تحقیق حاضر نیز عصاره گیاه سرخارگل باعث القای آپوتوزیس در پروتواسکولکس ها

ی کیست هیداتید گردید و مدت زمان لازم برای این مساله در مقایسه با بررسی فوق خیلی کوتاهتر ( ۴ ساعت ) بود که این تفاوت احتمالا می تواند به دلیل اختلاف در مقدار عصاره استفاده شده و شرایط آزمایش باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

Chica و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی اثر سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره هگزانی ریشه سه گیاه از سرخارگل با گونه های (*E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. purpurea*) بر روی رده های سلولهای سرطانی پانکراس (MIA PaCa-2) و کولون (COLO320) نشان دادند که هر سه گونه توانایی زنده ماندن سلول های سرطانی را به روش وابسته به زمان و غلظت، کاهش دادند. در این تحقیق گزارش کردند که گونه *E. pallida* با LC50 ۴۶ میکروگرم در میلی لیتر در سرطان پانکراس و با LC50 ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر در سرطان کولون، فعالترین گونه در کاهش سلولهای سرطانی مذکور بود و اعلام نمودند که عصاره گیاه مذکور با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۷ و قطعه قطعه کردن DNA در هسته، اثر آپوپتوتیک بر روی سلولهای مورد مطالعه داشت (۱۱۰). همچنین در بررسی دیگری محققین فوق، جهت مشخص کردن اثر آپوپتوتیک ترکیبات پلی استیلن و پلین های جدا شده از ریشه گیاه *Echinacea pallida* بر روی سلول های سرطانی پانکراس (MIA PaCa-2) و کولون (COLO320) به این نتیجه رسیدند که فعالیت آپوپتوزی ترکیبات فوق از گیاه مذکور، بصورت وابسته به غلظت و زمان، بر روی سلولهای سرطان کولون و پانکراس تاثیر داشته و باعث افزایش قابل توجه فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ و القاء آپوپتوزیس بر روی سلولهای سرطانی فوق بودند (۱۱۱). در مطالعه ما نیز همسو با مطالعات محققین فوق عصاره گیاه *E. purpurea* توانست با افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ بر روی پروتواسکولکس ها اثر آپوپتوتیک داشته باشد. محققین مذکور در بین گونه های مورد مطالعه اثر آپوپتوتیک گونه *E. Pallida* را بیشتر از گونه *E. purpurea* / اعلام نمودند که این مساله می تواند حاکی از وجود ترکیبات متنوع در گونه های مختلف و اختلاف در سلولهای مواجه شده با عصاره ها باشد.

Tsai و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر سیتوتوکسیک عصاره گیاه *E. purpurea* و شیکوریک اسید بر روی سلولهای سرطانی رحم (HCT-116) و کولون (Caco-2 cell) انسان را بررسی کردند. در تحقیق مذکور، سلولهای مورد نظر، با  $2000 \mu\text{g/ml}$  -  $0 \mu\text{g/ml}$  از عصاره اتانولی گیاه فوق و همچنین  $200 \mu\text{g/ml}$  -  $0 \mu\text{g/ml}$  اسید شیکوریک، در مدت زمان ۴۸-۲۴ ساعت، انکوبه شدند و نشان دادند که عصاره اتانولی گیاه مذکور و اسید شیکوریک به ترتیب در غلظت های  $2000 \mu\text{g/ml}$  -  $100 \mu\text{g/ml}$  و  $200 \mu\text{g/ml}$  -  $50 \mu\text{g/ml}$  توانستند، در مدت زمان ۴۸ ساعت باعث کاهش عملکرد آنزیم تلومراز ( آنزیم ویژه همانند سازی )، کاهش عملکرد سلول، افزایش معنی دار کاسپاز ۹، افزایش قطعات DNA و در نتیجه باعث القای آپوپتوزیس در سلولهای مذکور شوند که تمام این تاثیرات وابسته به دوز و زمان بود (۱۱۲). در مطالعه ما نیز همسو با مطالعه فوق، عصاره گیاه سرخارگل دارای اثر آپوپتوتیک قابل ملاحظه ای بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید بود و فعالیت کاسپاز ۹ را به مقدار معنی داری افزایش داد و این اثرات وابسته به غلظت گیاه سرخارگل بود. در بررسی حاضر برخلاف بررسی فوق، اثر آپوپتوتیک گیاه مورد مطالعه بر روی پروتواسکولکس ها در مدت زمان کمتری اتفاق افتاد که این مساله می تواند مربوط به غلظت زیاد عصاره مورد استفاده در بررسی ما باشد.

Zitkevicius و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر عصاره گیاه *E. purpurea* بر روی فعالیت میتوزی و آپوپتوزی سلولهای کبدی و کلیه موش آلوده شده با کادمیوم (آلاینده مهم صنعتی) را مورد بررسی قرار دادند. این محققین ابتدا عوارض ناشی از کادمیوم که عبات از آپوپتوزیس، فعالیت میتوزی سلولها و مرگ نکروتیک می باشد را ایجاد نمودند، سپس با مواجه ساختن آنها با عصاره گیاه فوق، اثر عصاره گیاه مذکور بر روی عوارض ایجاد شده فوق را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که عصاره گیاه فوق فعالیت میتوزی ایجاد شده با کادمیم را کاهش و فعالیت آپوپتوزی آن را افزایش دادند و همچنین اعلام نمودند که مواجهه طولانی مدت سلولها با کادمیوم باعث تشکیل کانون نکروزی در کبد شده و استفاده از عصاره گیاه مورد آزمایش می تواند باعث کم شدن کانون مورد نظر شود و این اثرات را وابسته به دوز گزارش کردند (۱۱۳). در مطالعه ما نیز

عصاره گیاه سرخارگل همراه با افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹، بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، اثر آپوپتوتیک داشت و این اثر وابسته به دوز بود که این تشابه تاثیر می تواند حاکی از مشابهت گیاهان مورد مطالعه باشد. ولی با توجه به اینکه بررسی ما یک بررسی برون تنی بوده، لذا جهت قضاوت بهتر، انجام آزمایشات درون تنی را طلب می کند.

An و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر آپوپتوتیک عصاره گل مینا (یکی از گیاهان هم خانواده سرخارگل) بر روی سلولهای سرطان سینه (MDA-MB-231 and SK-BR-3) و معده (AGS) انسان را مورد بررسی قرار دادند. محققین فوق نشان دادند که عصاره گیاه مذکور می تواند از طریق کاهش در بیان Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوزیس) و افزایش بیان Bax و P53 (القاء کننده های آپوپتوزیس) باعث مهار رشد سلولهای مذکور و ایجاد آپوپتوزیس در آنها نماید (۱۱۴). در مطالعه ما نیز عصاره گیاه سرخارگل توانست آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های کیست هیداتید را فعال نماید که توانایی القاء آپوپتوزیس توسط گیاه فوق و گیاه مورد مطالعه (سرخارگل) را می توان به هم خانواده بودن آنها و ترکیبات مشابه هر دو گیاه نسبت داد.

Singh و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر سیتوتوکسیک Artemisinin (ماده گرفته شده از گیاه *Artemisia annua*) (یکی از گیاهان هم خانواده سرخارگل) بر روی سلولهای سرطانی 4 – molt (سلولهای بدخیم رده لنفوئیدی) موش را در شرایط برون تنی، بررسی نمودند. در تحقیق مذکور، سلولهای سرطانی با  $\mu\text{M}$  ۲۰۰ از ماده فوق در مدت زمانهای ۸،۴،۲،۱ ساعت انکوبه شدند و نکروز را آپوپتوزیس ایجاد شده در سلولهای مذکور با روش DNA Diffusion بررسی کردند. در تحقیق فوق نشان داده شد که آرتمیسین با غلظت مذکور توانست به مقدار قابل توجهی تعداد سلولهای سرطانی را کاهش داده و القاء آپوپتوزیس در سلول های مذکور را افزایش دهد. در بررسی فوق هیچ سلول نکروتیکی مشاهده نشد. تغییرات ایجاد شده با زمان مواجه سلولها ارتباط مستقیم داشت (۱۱۵). در مطالعه حاضر نیز اثرات آپوپتوتیک عصاره

گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید می تواند به دلیل هم خانواده بودن این گیاه با گیاه فوق و وجود احتمالی ترکیبات مشابه در هر دو گیاه باشد.

همچنین یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر آپوتوتیک داروی ضد مالاریای Artemisinin بر روی اریتروسیت ها را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که داروی مذکور با ایجاد اختلال در بیوسنتز هم، می تواند از در هر دو مسیر میتوکندریایی و رسپتوری، در اریتروسیتها ایجاد آپوتوزیس نماید. همچنین در تحقیق فوق، افزایش فعالیت کاسپاز های ۸ و ۹ به صورت معنی داری گزارش گردید (۱۱۶). در مطالعه ما نیز تاثیر عصاره گیاه سرخارگل با افزایش فعالیت کاسپاز ۹ توانست باعث آپوتوزیس در پروتواسکولکس ها شود که این مشخصه می تواند توجیه گر ترکیبات مشابه دو گیاه هم خانواده *Artemisia* و *E.purpurea* با *annua* Artemisinin باشد. در مطالعه ما بر خلاف مطالعه فوق عصاره گیاه نتوانست باعث افزایش کاسپاز ۸ گردد که این مساله می تواند به اختلافات ترکیبی دو گیاه، میکروارگانیسم های مورد مواجهه با دارو، غلظتهای مورد استفاده و مدت زمان های مواجهه مربوط باشد و همچنین با توجه به تاثیر آپوتوتیک داروی فوق (Artemisinin) در هر دو مسیر داخلی و خارجی در سلولهای مورد مطالعه، احتمال تاثیر آپوتوتیک عصاره گیاه ما (سرخارگل) از مسیر خارجی نیز وجود دارد که این مساله نیازمند بررسی بیشتر می باشد.

Fullerton و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی اثرسیتوتوکسیک و آپوتوتیک بتاگلوکان (یک نوع پلی ساکارید موجود در ساختمان قارچهای خوراکی) با غلظت و مدت زمانهای مواجهه مختلف بر روی سلولهای سرطان پروستات (PC-3) انسان در شرایط برون تنی، به این نتیجه رسیدند که بیشترین درصد از مرگ سلولی توسط بتاگلوکان، در غلظت ۴۸۰ mg/ml و در مدت زمان ۲۴ ساعت اتفاق افتاد و گزارش نمودند که آپوتوزیس ایجاد شده در سلولهای سرطانی پروستات انسان، وابسته به غلظت و زمان مواجهه بود (۱۱۷). در مطالعه مانیز گیاه سرخارگل توانست آپوتوزیس را در پروتواسکولکس های کیست هیداتید ایجاد کند. با توجه به اینکه پلی ساکارید از ترکیبات موجود در عصاره گیاه سرخارگل نیز می باشد، لذا اثر آپوتوتیک عصاره گیاه

سرخارگل در مطالعه ما می تواند احتمالا به علت وجود ترکیب مذکور در گیاه مورد مطالعه باشد که البته نیاز به مطالعات تکمیلی و بیشتر دارد.

Chang و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی اثر آپوتوتیک اسید کافئیک گرفته شده از گیاه *Ocimum gratissimum* Linn بر روی سلولهای سرطانی سرویکس رحم در انسان جهت مشخص کردن مسیر مرگ سلولی، به این نتیجه رسیدند که اسید کافئیک موجود در گیاه مذکور می تواند بوسیله کاهش فعالیت Bcl-2 (مهار کننده آپپتوزیس) و آزادسازی سیتوکروم C و همچنین افزایش معنی دار فعالیت کاسپاز ۳، از طریق مسیر میتوکندریایی، در سلولهای سرطانی سرویکس رحم انسان، ایجاد آپپتوزیس نماید. همچنین محققین فوق اثرات مذکور را وابسته به دوز و زمان گزارش کردند (۱۱۸). اسید کافئیک که از ترکیبات مشابه در هر دو گیاه *Echinacea* (گیاه مورد مطالعه ما) و *Ocimum gratissimum* Linn می باشد، می تواند عامل اصلی در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و متعاقب آن، عامل فعال کردن مسیر آپپتوزیس از مسیر میتوکندریایی در مطالعه ما باشد که نیاز به بررسی و تحقیق بیشتری دارد، همچنین در مطالعه ما نیز همسو با بررسی فوق، آپپتوزیس پروتواسکولکس ها توسط عصاره گیاه سرخارگل وابسته به دوز بود.

Xiao و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر آپوتوتیک اسید شیکوریک بر روی سلولهای چربی 3T3-11 را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که ماده مذکور با اختلال تنظیم Bax (القاء کننده آپپتوزیس) و Bcl-2 (مهار کننده آپپتوزیس) و آزادسازی سیتوکروم C و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ می تواند باعث ایجاد آپپتوزیس وابسته به میتوکندری شود (۱۱۹). در مطالعه ما نیز گیاه سرخارگل باعث افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ و ایجاد آپپتوزیس در پروتواسکولکس ها گردید که با توجه به وجود اسید شیکوریک موجود در گیاه سرخارگل، می توان آپپتوزیس ایجاد شده در پروتواسکولکس ها را به این ماده نسبت داد که نیاز به تحقیق و بررسی بیشتری است.



علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه Kang و همکاران در سال ۲۰۰۸، اثر آپوپتوتیک ناشی از  $H_2O_2$  بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید را گزارش کردند و نشان دادند که ماده شیمیایی مذکور می تواند باعث افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۱ و مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردد (۱۲۰) همچنین محققین فوق در سال ۲۰۰۹ نیز، القاء آپوپتوزیس توسط دو ماده دگزامتازون و ATP، بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق فوق، پروتواسکولکس ها را در چهار گروه جداگانه و به ترتیب با ATP، دگزامتازون، دگزامتازون + ATP و همچنین محیط کشت RPMI 1640 به عنوان کنترل منفی مجاور کردند و گزارش نمودند که مواد شیمیایی فوق در ۲ گروه دگزامتازون و دگزامتازون + ATP باعث تغییرات مرفولوژیک پروتواسکولکس های کیست هیداتید از جمله کاهش حجم سلولی، حجیم شدن سیتوپلاسم، متورم شدن غشاء سلولی، افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و در نهایت القاء آپوپتوزیس در پروتواسکولکس های مذکور شدند و اثرات فوق در گروه دگزامتازون + ATP را بیشتر از گروه دگزامتازون گزارش کردند (۱۲۱). در مطالعه ما نیز عصاره گیاه سرخارگل با افزایش فعالیت کاسپاز ۳ توانست باعث القاء آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید شود. همچنین بعضی محققین دیگر، بیان مولکولهای القاء کننده آپوپتوزیس در کیستهای هیداتید نابارور در مقایسه با کیست های بارور و بافت سالم (۱۲۲، ۳۹) و اثر آپوپتوتیک برخی گیاهان دارویی (۱۲۳) و داروهای ضد انگلی (۱۲۴، ۱۲) بر روی پروتواسکولکس ها را گزارش نمودند.

## نتیجه گیری

عصاره گیاه سرخارگل در تمامی غلظت های مورد استفاده بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، توانست همراه با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ باعث آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها شود که اثرات مذکور فقط در غلظت های بالاتر (۵۰ و ۱۰۰ mg/ml) معنی دار بود.

## پیشنهادهات

با توجه به اثر آپوپتوتیک غلظت های بالای عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و همچنین تاثیر آن در افزایش کاسپاز های ۳ و ۹ انجام تحقیقات ذیل در آینده پیشنهاد می شود.

۱- بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط درون تنی.

۲- بررسی اثر آپوپتوتیک فراکشن های مختلف گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط برون تنی و درون تنی.

۳- بررسی اثر آپوپتوتیک ترکیبات موجود در گیاه سرخارگل بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید.

۴- بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه سرخارگل و فراکشن های مختلف آن بر روی ژنوتیپ های مختلف پروتواسکولکس های کیست هیداتید.

## References:

1. Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol Int* 2006; 55: 197-202.
2. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 107-135.
3. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003; 362: 1295-304.
4. Rokni MB. The present status of human helminthic diseases in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102(4): 283-95.
5. Adas G, Arikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolical agents on hydatid cysts (in vitro study). *World J Gastroenterol* 2009; 15: 112–6.
6. Topcu O, Aydin C, Arici S, Duman M, Sen M, koyoncu A. The effects of various scolical agents on the hepatopancreatic biliary system. *Chir Gastroenterol* 2006; 22 (3): 185–90.
7. Puryan K, Karadayi K, Topcu O. Chlorhexidine gluconate: an ideal colical agent in the treatment of intraperitoneal hydatidosis. *World J Surg* 2005; 29: 227-30.
8. Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiber officinale* R. on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. *Microbiol Res* 2011; 2: 91-4.
9. Harris JC, Plummer S, Turner MP, Lloyd D. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology* 2000; 146: 3119-27.
10. Paredes R, Jiménez V, Cabrera G, Iragüen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 2007; 100(5): 1200-9.
11. Verbrugge I, de Vries E, Tait SW, Wissink EH, Walczak H, Verheij M, Borst J. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2008; 27(5): 574-84.
12. Hu H, Jinfeng K, Chen R, Mamuti W, Wu G, Yuan W. Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Parasitol Res* 2011; 109: 453–9.
13. Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, Mattei v, Teggi A. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and

- polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1667-78.
14. Rigano R, Buttari B, De Falco E, Profumo E, Ortona E, Margutti P, Scottà C, Teggi A, Siracusano A. *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 2004; 26(1): 45-52.
  15. Pearson M, Blair D, Dai N, Zhang L, McManus D. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol* 2002; 124(01): 97-112.
  16. Thompson RA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *TRENDS Parasitol* 2002; 18(10): 452-7.
  ۱۷. ارفع ف. کرم شناسی پزشکی، انتشارات خسروی. چاپ اول. تهران. ۱۳۸۹: ۹۷-۱۰۶.
  18. Hsu TL, Lin G, Koizumi A, Brehm K, Hada N, Chuang PK, Wong CH, Hsieh SL, Díaz A. The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol Biochem Parasitol* 2013; 192(1): 55-9.
  19. Seoane PI, Rückerl D, Casaravilla C, Barrios AA, Pittini Á, MacDonald AS, Allen JE, Díaz A. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci Rep* 2016; 6: 39204.
  20. Díaz A, Casaravilla C, Irigoín F, Lin G, Previato JO, Ferreira F. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus*. *Trends parasitol* 2011; 27(5): 204-13.
  21. Acosta-Jamett G, Cleaveland S, Cunningham AA, Bronsvoort BM, Craig PS. *Echinococcus granulosus* infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. *Vet Parasitol* 2010; 169: 102-110.
  22. Rokni M. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iran J Parasitol* 2009; 4(2):1-16.
  23. Mandal S, Mandal MD. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(4): 253-60.
  24. Filippou D, Tselepis D, Filippou G, Papadopoulos V. Advances in liver echinococcosis: diagnosis and treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5(2): 152-9.
  25. Azlaf R, Dakkak A. Epidemiological study of the cystic echinococcosis In Morocco. *Vet Parasitol* 2006; 137: 83- 93.

26. OteroAbad B, Torgerson PR. A Systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *Plos Negl Trop Dis* 2013; 7 (6): 2249.
۲۷. لطفی م. بیماریهای انگلی هیداتید سیست در ایران و جهان، انتشارات سحاب. سال ۱۳۷۸: ۸۷-۱۲۰.
۲۸. مهبد ع، رضائیان م. انگل شناسی پزشکی مارکل، انتشارات تیمورزاده. سال ۱۳۸۵: ۲۲۰-۲۲۴.
29. Cardona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol* 2013; 192: 10–32.
30. Carmena D, Cardona GA. Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Vet parasitol* 2014; 202(3): 69-94.
31. Ito A, Budke CM. The echinococcoses in Asia: the present situation. *Acta Trop* 2017; 176: 11-21.
32. Dalimi A, Motamedi GH, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F. Echinococcosis/hydatidosis in western iran. *Vet parasitol* 2002; 105(2): 161-71.
33. Economides P, Christofi G, Gemmell M. Control of *Echinococcus granulosus* in cyprus and comparison with other island models. *Vet parasitol* 1998; 79(2): 151-63.
34. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 2009; 13(2): 125-33.
۳۵. موبدی ی، دلیمی آ. اپیدمیولوژی کیست هیداتید در ایران و جهان، انتشارات مقدم. تهران. ۱۳۷۳: ۱۴۷-۱۳۲.
۳۶. غفاری فر ف، اکینوکوکوس گرا نولوزوس و بررسی مبتلایان به کیست هیداتید، انتشارات پیوند مهر. چاپ اول. تهران. ۱۳۸۸: ۷۹-۹۱.
۳۷. مردانی ا، باباخان ل. عابدی ف، رفیعی م، مردانی ح. وضعیت اپیدمیولوژیک بیماران مبتلا به کیست هیداتید جراحی شده در بیمارستانهای شهر قم طی سالهای ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶. *مجله علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی گرگان*. دوره سوم. شماره ۲. پائیز و زمستان ۱۳۸۸: ۷-۱۰.
۳۸. خلیلی ب، شهرانی م، مرادی م. بررسی ده ساله فراوانی بیماران مبتلا به کیست هیداتید جراحی شده در بیمارستان های استان چهارمحال و بختیاری ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۶. *مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد*. دوره ۱۲. شماره ۱. بهار ۱۳۸۹: ۶۹-۷۴.
۳۹. موبدی ا، غلامی ش، شریف م، ضیائی ه. مطالعه انگل های کرمی روده ای سگ و شغال در مناطق مختلف جغرافیایی شهرستان ساری در سال ۷۱ تا ۷۲. *مجله علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران*. دوره ۹. شماره ۲۲ و ۲۳. بهار و تابستان ۱۳۷۸: ۱-۱۲.
۴۰. کوهدار و، شجاعی ش، رادمهر ب، پاکباز ف. بررسی کشتارگاهی میزان آلودگی گوسفندان مناطق مختلف ایران به کیست هیداتید. *نشریه پژوهش های بالینی دامپزشکی*. دوره اول. شماره اول. زمستان ۱۳۸۸: ۶۵-۷۴.

۴۱. مهران پ، قاسمی ر، سرمیدان ح. گزارش یک مورد پارگی کیست هیداتیک راجعه کبدی به داخل مجاری صفراوی. مجله علمی و پژوهشی طب جنوب. دوره ۱۳. شماره ۲. تابستان ۸۹: ۱۴۰-۱۳۷.
۴۲. فیاضی ن، بنی هاشمی ح. مورد غیر معمول کیست هیداتید کبد. مجله پزشکی هرمزگان. دوره ۱۱. شماره ۱. بهار ۸۶: ۹۷-۱۰۱.
۴۳. غلامعلی ک، ایرج ک، محسن جد، علی ر. بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی عوارض کلیوی گاو در منطقه شهرکرد. نشریه پژوهش و سازندگی. دوره ۲۱. شماره ۱. بهار ۸۷: ۷-۲.
۴۴. آقاجانزاده م، صادقی ش، جوافشانی م، جعفری م، دلشاد م. علایم و نشانه‌های بالینی و پیامد درمان در کیست هیداتید ریوی عارضه دار. مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان. دوره ۱۸. شماره ۷۰. پاییز ۹۲: ۴۹-۴۴.
۴۵. میرزا آقازاده ج. کیست هیداتید مغزی و بررسی موارد درمان شده در مرکز آموزش درمانی شهید مطهری ارومیه از سال ۱۳۶۹ تا ۱۳۷۹. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. دوره ۱۸. شماره اول. بهار ۱۳۸۶: ۴۳۵-۴۳۲.
۴۶. حلیمی م، شریعتی س، ترابی س، پور اصغری ب. گزارش یک مورد کیست هیداتیک استخوان ران. مجله دانشگاه علوم پزشکی تبریز. دوره ۳۳. شماره ۱. فروردین ۱۳۹۰: ۹۰-۸۶.
۴۷. یخچالی م، مردانی ک. مطالعه تنوع سویه های اکینوкокوس گرانولوزوس با تکثیر co1 به روش PCR-RFLP در استان آذربایجان غربی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. دوره ۲۳. شماره ۷. اسفند ۹۱: ۷۹۸-۷۹۲.
48. Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, Andalib AR. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran. Acta trop 2011; 117(1): 47-50.
۴۹. یوسفی ح، هاشم زاده م، علی یاری ز، فرخی ع، زبردست ن. بررسی مولکولی سویه های مولد کیست هیداتید گوسفندی در استان چهار محال بختیاری با استفاده از پلی مورفیسم قطعه طولی محدود. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. دوره ۹. شماره ۲. تابستان ۱۳۸۶: ۳۳-۲۸.
50. Taha HA. Genetic variations among *Echinococcus granulosus* isolates in Egypt using RAPD-PCR. Parasitol Res 2012; 111(5): 1993-2000.
51. Dursun M, Terzibasiglu E, Yilmaz R, Cekrezi B, Olgar S, Nisli K, Tunaci A. Cardiac hydatid disease: CT and MRI findings. Am J Roentgenol 2008; 190: 226-32.
52. Ilica AT, Kocaoglu M, Zeybek N, Guven S, Adaletli I, Basgul A, Coban H, Bilici A, Bukte Y. Extrahepatic abdominal hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*: imaging findings. AJR Am J Roentgenol 2007; 189(2): 337-43.
53. Yarzabal LA, Schantz PM, Lopez-Lemes MH. Comparative sensitivity and specificity of the casoni intradermal and the immunoelectrophoresis tests for the diagnosis of hydatid disease. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(5): 843-8.

54. Devi Chandrakesan S, Parija SC. Latex agglutination test (LAT) for antigen detection in the cystic fluid for the diagnosis of cystic echinococcosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(2): 123-6.
55. Barbieri M, Sterla S, Battistoni J, Nieto A. High performance latex reagent for hydatid serology using an *echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *Int J Parasitol* 1993; 23(5): 565-72.
56. Ravinder P, Parija S, Rao KS. Urinary hydatid antigen detection by coagglutination, a cost-effective and rapid test for diagnosis of cystic echinococcosis in a rural or field setting. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 2972-4.
57. Savardashtaki A, Sarkari B, Arianfar F, Mostafavi-Pour Z. Immunodiagnostic value of *Echinococcus Granulosus* recombinant B8/1 subunit of antigen B. *Iran J Immunol* 2017; 14(2): 111-22.
58. Ito A. Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. *Parasitol int* 2002; 51(3): 221-35.
59. Leggatt G, Yang W, McManus D. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(2): 189-92.
60. Lightowlers MV, Jensen O, Fernandez E, Iriarte JA, Woollard DJ, Gauci CG, Jenkins DJ, Heath DD. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int J Parasitol* 1999; 29(4): 531-4.
61. Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet infect dis* 2007; 7(6): 385-94.
۶۲. گلفام ف، گلفام پ، خلج ع. سید مرتاض س، طاهری ح، امینی م. تحول در روش های درمانی کیست هیداتید کبد. نشریه حکیم. دوره ۱۱. شماره ۳. پائیز ۱۳۸۷: ۲۶-۲۰.
۶۳. جمشیدی م، محرز م، زنگنه م، جمشیدی ماکانی ع. ارزیابی درمان دارویی کیست هیداتیک با آلبندازول و پرازی کوانتل. فصلنامه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۱۷. شماره ۳. پائیز ۸۶: ۱۶۰ - ۱۵۷.
۶۴. حضرتی تپه خ، آقازاده ج، موسوی ج. بررسی اثر محلول آلبندازول سولفوکساید در از بین بردن پروتواسکولکس های اکینوкокوس گرانولوزوس. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. دوره ۱۹. شماره دوم. تابستان ۱۳۸۷: ۱۲۴ - ۱۲۰.
65. Dalimi A, Ghaffari Far F, Zavaran Hossieni A. Association between serum IL-4 levels and cyst relapsing in cystic echinococcosis. *Arch Razi Inst* 2003; 56: 71-80.

66. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4): 239-57.
67. Mohsin MA, Morris SJ, Smith H, Sweet C. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and hemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have role in these associations. *Virus Res* 2002; 85 (2): 123-31.
68. Hood C, Cunningham AL, Slobedman B, Boadle RA, Abendroth A. Varicella-zoster virus-infected human sensory neurons are resistant to apoptosis, yet human foreskin fibroblasts are susceptible: evidence for a cell-type-specific apoptotic response. *J Virol* 2003; 77 (23): 12852-64.
69. Bolchon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papilloma viruses are pro-apoptotic. *Biochimie* 2003; 85(8): 813-91.
70. Rajaei F, Karja NW, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Murakami M, Sambuu R, Nii M, Otoi T. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. *Reprod in domes anim.* 2005; 40(5): 429-32.
71. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407(6805): 769-801.
72. Cory S, Strasser A, Jacks T, Corcoran LM, Metz T, Harris AW, Adams JM. Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59: 365-7.
73. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther* 2004; 101 (1): 1-15.
74. Rajaei F, Otoi T. Effect of cryoprotectants on DNA fragmentation in porcine blastocysts. *J Reprod Infertil* 2007; 5: 37-43.
75. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88 (3): 355-65.
76. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92 (1): 57-70.
77. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66 (8): 1453-8.
78. Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: Focus on P53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 2003; 13 (2): 169-78.



79. Borhani N, Rajaei F, Salehi Z, Javadi A. Analysis of DNA fragmentation in mouse embryos exposed to an extremely low frequency electromagnetic field. *Electromagn Biol Med* 2011; 30 (4): 246-52.
80. Rajaei F, Soleimanirad J, Niknafs B, Ghaffari M, Safaeian A. Effect of vitrification on apoptosis in mouse blastocysts. *J Reprod Infertil*. 2004; 5(1): 14-22.
81. Reed JC. Bcl-2 family protein. *Oncogen* 1998; 17: 3225-36.
82. Zibaei M, Sarlak A, Delfan B, Ezatpour B, Azargoon A. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. *Korean J Parasitol* 2012; 50: 53-6.
83. Moazeni M, Nazer A. In vitro effectiveness of Garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Plast Surg* 2010; 34: 2677-81.
84. Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscolices. *Vet Parasitol* 2012; 187(1-2): 203-8.
85. Rouhani S, Salehi N, Kamalinejad M, Zayeri F. Efficacy of *Berberis vulgaris* aqueous extract on viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *J Invest Surg* 2013; 26: 347–51.
86. Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW, Ito A. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B. *Parasitol Int* 2006; 55: 57-62.
87. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunol* 2006; 118(2): 271-8.
88. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 2004; 95(2): 159-64.
89. Kerr LJ, Potten CS, Booth CE, Grencis RK. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1556-64.
90. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 2001; 69(25-26): 2957-64.
91. Cecconi F, AlvarezBolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998; 94(6): 727-37.
92. Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008; 60(6): 390-7.

93. Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepień H, Stepień T, Kuzdak K, Ulanska J. P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(10): 297-300.
94. Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996; 33: 1053-9.
95. Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002; 9: 1126-39.
96. Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38: 223-43.
97. Carneiro Santos P, Martins Filho O, Alves Oliveira LF, Silveira A, Coura Filho P, Viana IR, Wilson RA, Correa Oliveira R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human *Schistosomiasis mansoni*. *Parasite Immunol* 2000; 22(6): 267-77.
98. Tato P, Fernandez AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepulveda J, Molinari JL. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res* 2004; 92: 197-204.
99. Hwang S, Kobayashi C, Agata K, Ikeo K, Gojobori T. Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay. *Gene* 2004; 333: 15-25.
۱۰۰. حاجی مهدی پور ه، خانوی م، شکرچی م، عابدی ز، پیرعلی همدانی م. بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی موجود در گیاه سرخارگل. فصلنامه علمی و پژوهشی گیاهان دارویی. جلد ۴. شماره ۳۲. سال ۹۳: ۱۵۲-۱۴۵.
101. Zengqi L, Tiexin T, Shejian L, Xiping N, Mei B, Hong W. The synthesis and storage sites of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea*. *Am J Plant Sci* 2012; 3(4): 551-8.
۱۰۲. ایزدی ز، سروش زاده ع، مدرس ثانوی س، اثنی عشری م، داودی پ. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه سرخارگل و شناسایی ترکیب های شیمیایی آن. دو ماهنامه طب جنوب. پژوهشکده زیست پزشکی خلیج فارس. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر. دوره ۱۷. شماره ۱. بهار ۹۳: ۶۹-۵۸.
۱۰۳. اندرگانی س، جمشیدی س، اورعی م. اثر ضدباکتریایی اسانس گل و عصاره اندام های گیاه سرخارگل بر باکتری *Pectobacterium caratovororum subsp. caratovororum* در شرایط آزمایشگاه. فصلنامه تحقیقات بیماریهای گیاهی. دوره ۲. شماره ۳. تابستان ۱۳۹۳: ۳۴-۲۵.

۱۰۴. قائمی ا، سلیمان جاهی ح، فرشباغ مقدم م، یزدانی ن، ذکی دیزجی ح. ارزیابی اثر فعالیت ضد ویروسی عصاره پیکر رویشی سرخارگل در کنترل ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی. مجله پژوهشی حکیم. جلد نهم. شماره چهارم. زمستان ۸۵: ۵۹-۶۴.

105. Binns SE, Purgina B, Bergeron C. Light-mediated antifungal activity of Echinacea extracts. *Planta Med* 2000; 66(3): 241-4.

۱۰۶. جوادی مرند ف. بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی مورد، زرد چوبه، درمنه کوهی، آویشن شیرازی، سرخارگل و فلفل سیاه در *In vitro*. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال ۹۴-۹۳.

۱۰۷. مصلی س. بررسی اثر پروتواسکولیسیدال گیاهان دارویی و تعیین اثر ایمونومدولاتوری گیاهان پروتواسکولیسید بر روی سلولهای دندریتیک. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال ۹۳-۹۲.

۱۰۸. محمدی ت. بررسی فراکشن های مختلف گیاه سرخارگل بر روی کیست هیداتید و تعیین اثر ایمونومدولاتوری آنها بر روی رده های سلولی J 774A. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی قزوین، سال ۹۵-۹۴.

109. Driggins SN. The anti-carcinogenic effect of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* on a mammalian breast cancer cell line. Unpublished ph.D dissertation. Tennessee state university press, 2005.

110. Chicca A, Adinolfi B, Martinotti E, Fogli S, Breschi M, Pellati F, Benvenuti S, Nieri P. Cytotoxic effects of Echinacea root hexanic extracts on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(1): 148-53.

111. Chicca A, Pellati F, Adinolfi B, Matthias A, Massarelli I, Benvenuti S, Bianucci AM, Bone K, Lehmann R, Nieri P. Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*. *Br J Pharmacol* 2008; 153(5): 879-85.

112. Tsai YL, Chiu CC, YiFu Chen J, Chan KC, Lin SD. Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. *J Ethnopharmacol* 2012; 143(3): 914-9.

113. Zitkevicius V, Smalinskiene A, Savickiene N, Savickas A, Ryselis S, Sadauskiene I, Zitkevicius V, Savickas A. Assessment of the effect of *Echinacea purpurea* extract on the accumulation of cadmium in liver and kidney: apoptotic-mitotic activity of liver cells. J Med Plant Res 2011; 5(5): 743-50.
114. An IJ, Kwon JK, Lee JS, Park HS, Kim DC, Choi BJ. Induction of apoptosis in human cancer cells with compositae extracts. Prev Nutr Food Sci 2012; 41(5): 584-90.
115. Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. Anticancer Res 2004; 24(4): 2277-8.
116. Yang R, Yan S, Zhu X, Li CY, Liu Z, Xiong JW. Antimalarial drug artemisinin depletes erythrocytes by activating apoptotic pathways in zebrafish. Exp Hematol 2015; 43(4): 331-41.
117. Fullerton S, Samadi A, Tortorelis D, Choudhury M, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (maitake mushroom polysaccharide). Mol urol 1999; 4(1): 7-13.
118. Chang WC, Hsieh CH, Hsiao MW, Lin WC, Hung YC, Ye JC. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. Taiwan J Obstet Gynecol 2010; 49(4): 419-24.
119. Xiao H, Wang J, Yuan L, Xiao C, Wang Y, Liu X. Chicoric acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes through ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. J Agric Food Chem 2013; 61(7): 1509-20.
120. Kang J, Hu H, Chen R. In vitro observation on the apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2008; 26(5): 332-7.
121. Kang J, Hu H, Yuan W, Wu G, Chen R, Baishanbieke W, Aisaiti k. Apoptosis induced in vitro by dexamethasone and ATP in the protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2009; 27(4): 332-5.

122. Spotin A, Mokhtari Amirmajdi M, Sankian M, Varasteh A, Vahedi F, hamsian A. Expression of apoptosis inducing-ligands, TRAIL and Fas-L in hydatid cyst germinal layer and normal tissue. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 12(1): 7-15 (Full Text in Persain).
123. Pensel P, Maggiore M, Gende L, Eguaras M, Denegri M, Elissondo M. Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. Inter discip perspect infect dis 2014; 12 pages.
124. De S, Pan D, Bera AK, Sreevatsava V, Bandyopadhyay S, Chaudhuri D, Kumar S, Rana T, Das S, Das SK, Suryanaryana VV, Singh MN, Bhattacharya D. In vitro assessment of praziquantel and a novel nanomaterial against protoscolices of *Echinococcus granulosus*. J helminthol 2012; 86(1): 26–9.
125. Hajiaghaee R, Monsef Esfahani HR, Khorramizadeh MR, Saadat F, Shahverdi AR, Attar F. Inhibitory effect of aerial parts of *Scrophularia striata* on matrix metalloproteinases expression. Phytother Res 2007; 21(12): 1127-9.
126. Haniloo A, Ghasemi F, sheikhi AK, Ghavami MB. Immunoregulatory cytokine (TGF- $\alpha$  and IL- 10) responses in mice inoculated with protoscolices and major hydatid fluid antigens of cystic echinococcosis. Iran J parasitol 2008; 3: 18-23.
127. Smyth JD, Barrett NJ. Procedure for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal, especially after chemotherapy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74: 649–52.

## **A study on apoptotic activity of *Echinacea purpurea* extract in protoscolices of hydatid cyst**

### **Abstract**

**Background:** The medicinal herbal plant *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*) is effectively used in the treatment of numerous diseases including infectious diseases but despite its obvious scolicidal activity, the mechanism of action through which this effect is achieved remains obscure.

**Objective:** The aim of this study was to assess the induction of apoptosis in protoscolices of hydatid cyst by the medicinal plant *E. purpurea*.

**Materials and Methods:** Protoscolices were aseptically aspirated from hydatid cysts and their viability was tested by staining with 0.1% eosin solution. Sufficient number of protoscolices determined by Bradford method, were incubated with different concentrations of *E. purpurea* extract (5, 50, and 100 mg/ml) at 37 °C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 4 hrs. Evaluating the induction of apoptosis and also assessing the activity of caspases 3, 8, and 9 in the extract-treated protoscolices, were performed using ELISA-based commercial kits for both apoptosis and different caspase activity.

**Results:** All concentrations of *E. purpurea* extract showed apoptotic effect on hydatid cyst protoscolices and also increased the activity of caspases by these parasitic organisms and that the significant effects were only observed at two concentrations (50 and 100 mg/ml) of the extract. The significant apoptotic effect of *E. purpurea* extract on protoscolices was observed at concentrations 50 and 100 mg/ml by 36.3% and 46.09%, respectively. Also, the significant increasing effect on activity of caspases 3 and 9 at the same concentrations was demonstrated by 41.8% and 58.6% for caspase 3 and 11.4% and 48.4% for caspase 9, respectively.

The activity of caspase 8 showed no considerable change when treated with the extract of *E. purpurea*.

**Conclusion:** Based on the data observed in the present study, apoptosis could be considered as one of the important scolicidal mechanism of the extract of *E. purpurea* plant however, more studies are needed.

**Keywords:** Hydatid cyst, Protoscolex, *E. purpurea*, Apoptosis, Caspase



**Qazvin University of Medical Sciences**

**Faculty of medicine dissertation for receiving master's**

**Degree in medical parasitology**

**Title:**

A study on apoptotic activity of Echinacea purpurea extract in protoscolices of  
hydatid cyst

**Supervisors:**

Dr. M. Shahnazi - Dr. A. Azadmehr

**Advisors:**

Dr. R. Hajiaghaee - Dr. M. Alipour

**By:**

Marziyeh Makian

2016-2017

**Number thesis: 73**